

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Zum Endothelinsystem im Morris-Hepatom-7777 -  
Behandlung mit Endothelinrezeptorantagonisten  
in vitro und in vivo**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
**Thiemo Pfab**  
aus Bonn

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter:      1. PD Dr. B. Hoher  
                         2. Prof. Dr. F. Körber  
                         3. Prof. Dr. F. Theuring

Datum der Einreichung: 13. August 1999

Datum der Promotion: 18. September 2000

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,  
das Erforschliche erforscht zu haben  
und das Unerforschliche ruhig zu verehren.

(Goethe, Maximen und Reflexionen)

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Endothelinsystem.....	1
1.1.1	Entdeckung des Endothelins (ET).....	1
1.1.2	Die Endothelinfamilie .....	2
1.1.3	Genetik, Regulation, Biosynthese und Elimination des ET .....	4
1.1.4	Vorkommen und Wirkung des Endothelins .....	6
1.1.5	Endothelin als Wachstumsfaktor .....	9
1.1.6	Die Endothelinrezeptoren.....	12
1.1.7	Die Signaltransduktion .....	13
1.1.8	Die Endothelinrezeptorantagonisten .....	14
1.2	Das <i>Morris</i> -Hepatom .....	17
1.3	Fragestellung der Arbeit .....	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1	Material .....	21
2.1.1	Geräte .....	21
2.1.2	Chemikalien .....	22
2.1.3	Zellen und Hepatome.....	24
2.1.4	Versuchstiere und ihre Haltung.....	25
2.2	Zellkultur.....	26
2.2.1	Kulturbedingungen und Passage .....	26
2.2.2	Inkubation mit ET-1 und ET-Rezeptorantagonisten .....	27
2.2.3	Proliferationsassays .....	28
2.2.3.1	<i>MTT</i> -Assay .....	28
2.2.3.2	<i>BrdU</i> -Assay.....	29
2.2.4	LDH-Bestimmung.....	30
2.2.5	Trypanblau-Färbung.....	31
2.2.6	ET-1-Bestimmung .....	31
2.3	Untersuchungen an hepatomtragenden Buffalo-Ratten .....	32
2.3.1	Präparation von Hepatomen und Leber .....	32
2.3.2	Bestimmung von Plasma- und Gewebe-ET-1 und -Big-ET-1.....	32
2.3.2.1	Plasmagewinnung .....	32
2.3.2.2	Extraktion von Gewebe-ET-1 und -Big-ET-1.....	32
2.3.2.3	Proteinbestimmung .....	33
2.3.2.4	ET-1- und Big-ET-1-Assay .....	35
2.3.3	<i>Scatchard</i> -Rezeptor-Bindungsstudie .....	36
2.3.3.1	Präparation der rohen Plasmamembranfraktion .....	36
2.3.3.2	Bindungsstudie .....	37
2.3.4	Behandlungsversuch mit <i>LU 302872</i> .....	39
2.3.4.1	Tumorstadiumsmessung mit Schublehre .....	41
2.3.4.2	Sonographische Tumorstadiumbestimmung.....	41
2.3.4.3	Messung von Tumorgewicht und -volumen nach Entnahme .....	42
2.3.4.4	Serumanalysen.....	42
2.4	Statistische Verfahren .....	43

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Plasma- und Gewebekonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 bei hepatomtragenden Buffalo-Ratten .....	45
3.1.1	Plasmakonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 .....	45
3.1.2	Proteinkonzentrationen in Hepatom- und Lebergewebe .....	46
3.1.3	Gewebekonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 .....	46
3.2	ET-Rezeptoren in Hepatom- und Lebergewebe .....	49
3.2.1	ET <sub>A</sub> - und ET <sub>B</sub> -Rezeptordichte in Hepatom- und Lebergewebe .....	49
3.2.2	Bindungsaffinität der ET <sub>A</sub> - und ET <sub>B</sub> -Rezeptoren .....	52
3.3	Wachstumsverhalten der MH-7777-Zellen bei Inkubation mit ET-1 und ET- Rezeptorantagonisten .....	53
3.3.1	LDH-Bestimmung .....	57
3.3.2	Trypanblau-Färbung .....	57
3.3.3	ET-1-Bestimmung .....	58
3.4	Behandlungsversuch des MH-7777 mit LU 302872 .....	59
3.4.1	Vorversuch zur Trinkmengenbestimmung .....	59
3.4.2	Wachstumsverhalten des MH-7777 bei Behandlung .....	60
3.4.3	Gewicht und Trinkmengen der Tiere im Behandlungsversuch .....	63
3.4.4	Organgewichte nach dem Behandlungsversuch .....	66
3.5	Serumparameter gesunder und hepatomtragender Buffalo-Ratten .....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
4.1	Das Endothelinsystem im <i>Morris-Hepatom-7777 in vivo</i> .....	71
4.1.1	Plasmakonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 bei hepatomtragenden Buffalo-Ratten .....	71
4.1.2	Gewebekonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 bei hepatomtragenden Buffalo-Ratten .....	74
4.1.3	ET-Rezeptoren in Hepatom- und Lebergewebe .....	75
4.2	Bedeutung des ET-Systems für das Wachstum von MH-7777-Zellen <i>in vitro</i> ..	79
4.3	Wachstumshemmung des MH-7777 durch LU 302872 <i>in vivo</i> .....	86
4.3.1	Vorbemerkung .....	86
4.3.2	Wachstumsverhalten des MH-7777 bei Behandlung mit LU 302872 .....	87
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
5.1	Summary .....	97
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung an Eides Statt .....</b>	<b>119</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Endothelinsystem

### 1.1.1 Entdeckung des Endothelins (ET)

Die Entdeckung des Endothelins vor ca. zehn Jahren hat zu einem starken, bis heute unvermindert anhaltenden internationalen Interesse an dieser Substanz und dem damit verbundenen physiologischen Regulationssystem geführt. Die rege Forschungstätigkeit erstreckt sich auf immer weitere Bereiche des menschlichen Organismus, um die vielfältige Bedeutung des Endothelinsystems für physiologische und pathophysiologische Prozesse besser zu verstehen.

Die ersten Hinweise auf die Existenz des Endothelins ergaben sich im Rahmen der Forschungsbemühungen, die Rolle des Endothels als stoffwechselaktives Organ aufzuklären. Noch vor relativ kurzer Zeit galt das Endothel lediglich als eine passive Diffusionsbarriere zwischen Intra- und Extravasalraum. Inzwischen ist bekannt, daß das Endothel entscheidende Funktionen in bezug auf Koagulation, Lipidtransport, Immunreaktion und Gefäßtonus erfüllt. Erste wichtige Schritte auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der vielfältigen Bedeutung des Endothels waren die Entdeckungen des Prostacyclin (MONCADA et al., 1976) und des *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF)(FURCHGOTT et al., 1980), der später als NO identifiziert wurde (PALMER et al., 1987). Man hatte damit zwei vasodilatatorisch wirkende Substanzen entdeckt, die von den Endothelzellen synthetisiert werden.

Auf der Suche nach Gegenspielern zu diesem dilatatorischen Prinzip führte schon 1982 ein „wissenschaftlicher Zufall“ zum Nachweis der Wirkung des gesuchten *endothelium-derived constricting factor* (EDCF). Bei der Untersuchung des EDRF durch Zugabe von Kulturüberstand aus Rinderaortenendothelzellen auf isolierte Schweinekoronarien beobachtete man unerwarteterweise eine langanhaltende Konstriktion, da der labilere EDRF während des Transports abgebaut worden war. Weil der Effekt proteasesensitiv war, wurde ein Peptid als Ursache postuliert (HICKEY et al., 1985). Diese Beobachtung wurde in weiteren Studien erhärtet (GILLESPIE et al., 1986; O'BRIEN et al., 1987). O'BRIEN et al. (1987) konnten die Peptidstruktur des neuen Faktors bestätigen und registrierten ebenfalls eine langanhaltende Vasokonstriktion. Diese erwies sich als resistent gegenüber bekannten Antagonisten unter anderem der Serotonin-,

Histamin-,  $\alpha$ -adrenergen- und Angiotensin II-Rezeptoren und schien somit auf einem bis dahin unbekannten Prinzip zu beruhen.

1988 gelang es schließlich YANAGISAWA et al., das Peptid aus knapp zehn Litern Kulturüberstand von Endothelzellen aus Schweineaorta zu isolieren, zu sequenzieren und seine Vorstufe Präproendothelin zu klonieren. Entsprechend seinem Ursprungsort gaben sie der Substanz den Namen Endothelin (ET). YANAGISAWAS Gruppe konnte die starke gefäßverengende Wirkung des Endothelins *in vivo* bestätigen. Sie erwies sich als ein bis zwei Größenordnungen stärker als die vasokonstriktive Wirkung von Angiotensin II und anderer gefäßverengender Substanzen wie z.B. ADH und Neuropeptid Y und ist damit die potenteste vasokonstriktiv wirkende Substanz, die bis heute isoliert wurde.

Ein Jahr später wurde die Entdeckung von zwei weiteren Isoformen des Endothelins, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden, publiziert (INOUE et al., 1989a). Die zuerst entdeckte Form heißt nun Endothelin-1 (ET-1), die weiteren Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3).

Es zeigte sich, daß Endotheline in Säugetierorganismen weit verbreitet sind, sie wurden inzwischen sogar in mehreren wirbellosen Spezies sowie Fischen gefunden (KASUYA et al., 1991).

In kürzester Zeit ist die Forschung zum Endothelinsystem hinsichtlich seiner Grundlagen, seiner Bedeutung und seiner medikamentösen Beeinflußbarkeit so weit fortgeschritten, daß schon sieben Jahre nach der Erstbeschreibung des ET-1 die erste größere pharmakologische Studie zur Beeinflussung des Endothelinsystems bei Herzinsuffizienz mittels ET-Rezeptorantagonisten durchgeführt werden konnte (KIOWSKI et al., 1995). Auch in vielen anderen Bereichen der Medizin wird zunehmend versucht, die Patienten direkt von den neuen Kenntnissen dieses Regulationssystems profitieren zu lassen.

### **1.1.2 Die Endothelfamilie**

Die Endotheline sind eine Familie aus drei verwandten Peptiden (INOUE et al., 1989a), die folgende Gemeinsamkeiten aufweisen: Sie bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren, besitzen einen C-terminalen Tryptophanrest, eine kurze Sequenz geladener Aminosäuren und vier Cysteinreste, die über Disulfidbrücken die Positionen 1 und 15 sowie 3 und 11 miteinander verbinden und damit zu der charakteristischen Haarnadelform der Moleküle beitragen.



ET-1 hat eine relative Molmasse von 2492. Es ist in Schwein, Katze und Mensch identisch (ITO et al., 1988).

ET-2 weicht in nur zwei und ET-3 in sechs Aminosäuren von der Sequenz des ET-1 ab (siehe Tabelle 1). In Mäusen wurde ein weiteres verwandtes Peptid nachgewiesen, das in bezug auf ET-2 nur eine abweichende Aminosäure aufweist. Es wurde VIC (*vasoactive intestinal contractor*) genannt und scheint lokale Funktion im Gastrointestinaltrakt zu haben (SAIDA et al., 1989).

Die Tertiärstruktur der Endotheline ist nicht endgültig geklärt, u.a. wird eine helixartige Formation im zentralen Bereich der Region *Lys<sup>9</sup>-Cys<sup>15</sup>* vermutet (ENDO et al., 1989; SAUDEK et al., 1991). Entscheidend für die Wirkung scheinen die Disulfidbindungen und die C-terminale Domäne zu sein, da bei Veränderungen in diesem Bereich die biologische Aktivität stark abnimmt (KIMURA et al., 1988; RANDALL et al., 1989).

**Tabelle 1: Struktur der ET/STX-Peptidfamilie.** Die Sequenz der drei humanen ET sowie der vier Sarafotoxine (STX, siehe unten) ist an zehn Positionen identisch. Diese sind bei ET-1 fett gedruckt. Abweichende Aminosäuren sind jeweils dargestellt. Rahmen markieren die Cysteine (C), an denen sich die charakteristischen Disulfidbrücken befinden. Die Buchstaben entsprechen den international üblichen Abkürzungen für Aminosäuren.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ET-1	<b>C</b>	S	<b>C</b>	S	S	L	M	<b>D</b>	K	<b>E</b>	<b>C</b>	V	Y	F	<b>C</b>	H	L	D	I	I	W
ET-2						W		L													
ET-3		T		F	T	Y	K							Y							
STXa				K	D	M	T					L	N				Q		V		
STXb				K	D	M	T					L					Q		V		
STXc		T		N	D	M	T		E			L	N				Q		V		
STXd		T		K	D	M	T					L					Q				

Während diese Peptidfamilie eine für Säuger einmalige Struktur aufweist, wurden große Ähnlichkeiten mit Neurotoxinen wie dem Bienengift Apamin und dem  $\alpha$ -Skorpion-Toxin festgestellt, die ebenfalls mehrere Disulfidbrücken enthalten (YANAGISAWA et al., 1988). Hohe Sequenz- und Bioaktivitätshomologien bestehen außerdem mit Giften der israelischen Natter *Atractaspis engaddensis*, den Sarafotoxinen (KLOOG et al., 1988), welche zu Herzinfarkt durch Koronarkonstriktion führen können (WOLLBERG et al., 1987; TAKASAKI et al., 1988) und damit möglicherweise schon zum Ableben Kleopatras (30 v. Chr.) beitrugen. Diese Befunde legen die Vermutung einer evolutiv alten Gen-Superfamilie mit gemeinsamen Wurzeln nahe (LANDAN et al., 1991).

### 1.1.3 Genetik, Regulation, Biosynthese und Elimination des ET

Im menschlichen Genom werden alle drei Vorläufer der ET-Isoformen durch ein eigenes Gen kodiert (INOUE et al., 1989a). So befindet sich z.B. das humane Präproendothelin-1-Gen (Präpro-ET-1 ist der Vorläufer von ET-1) auf dem Chromosom 6 (BLOCH et al., 1989b), das Gen für Präproendothelin-3 dagegen auf Chromosom 20 (BLOCH et al., 1989a). Das humane Präpro-ET-1 Gen beinhaltet fünf Exons und vier Introns und erstreckt sich über ca. 6,8 kb DNA (INOUE et al., 1989a,b; BLOCH et al., 1989b).

In den nicht-transkribierten Genbereichen findet man regulatorische DNA-Sequenzen. So gibt es in der 5'-flankierenden Region des Gens Bindungsstellen für *activating protein-1* (AP-1) und *nuclear factor 1*, über die z.B. Angiotensin II und TGF $\beta$  mittels Proteinkinase C und *c-fos/c-myc*-Genprodukten die ET-1-Expression induzieren können (INOUE et al., 1989b). In der 3'-Region findet man poly-AUUUA-mRNA kodierende Sequenzen. Diese regulieren die selektive Destabilisierung von Präpro-ET-1-mRNA und beeinflussen dadurch wahrscheinlich seine relativ kurze intrazelluläre Halbwertszeit von 15 min (INOUE et al., 1989b; MASAKI et al., 1991). Dies könnte ein möglicher Regulationsmechanismus der ET-1-Synthese auf Transkriptions- und Translationsebene sein.

Die ET-1-Synthese läßt sich durch eine Vielzahl von Substanzen und anderen Einflußgrößen induzieren (siehe Tabelle 2).

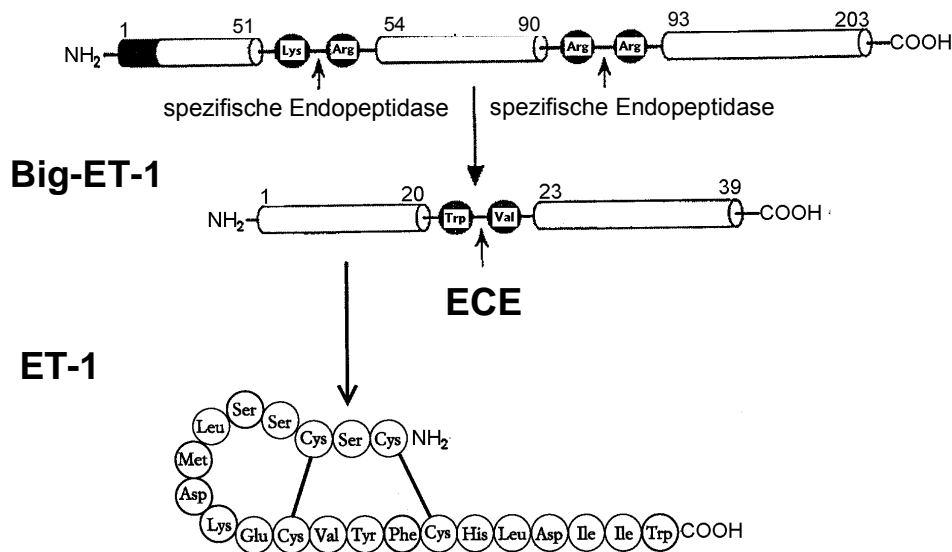
**Tabelle 2: ET-1-Synthese-induzierende Faktoren.**

<b>Hormone</b>	Adrenalin	YANAGISAWA et al., 1988
	Angiotensin II, ADH	BAKRIS et al., 1991; EMORI et al., 1991
	Cortisol	KANSE et al., 1991
	Insulin	OLIVER et al., 1991
<b>Peptide</b>	Cytokine, TGF $\beta$	KURIHARA et al., 1989a
	<i>epidermal growth factor</i> (EGF)	CASEY et al., 1991
	<i>Insulin-like growth factor-1</i> (IGF-1)	MATSUMOTO et al., 1990
	Interleukin 1	YOSHIZUMI et al., 1990
	ET-3	YOKOKAWA et al., 1991
	Endotoxin	SUGIURA et al., 1989
<b>Xenobiotika</b>	Ca <sup>2+</sup> -Ionophor A23187	YANAGISAWA et al., 1988
	Ciclosporin	YAMAUCHI et al., 1990
<b>Physikalische und chemische Stimuli</b>	Hypoxie	RAGUKI et al., 1990; KOUREMBANAS et al., 1991
	schwacher „ <i>shear stress</i> “	MILNER et al., 1990
<b>Blutbestandteile</b>	Thrombin	YANAGISAWA et al., 1988
	Oxidiertes <i>low-density lipoprotein</i>	BOULANGER et al., 1992
	Glukose	YAMAUCHI et al., 1990

Der wichtigste Inhibitor der ET-1-Synthese ist der physiologische ET-1 Gegenspieler Stickstoffmonoxid (NO) (BOULANGER et al., 1990; GOLIGORSKI et al., 1994). Im Gegensatz zu schwachem „*shear stress*“ führt starker „*shear stress*“ an den Gefäßwänden zur

Freisetzung von *NO* und hemmt dadurch die ET-1-Expression (MILLER et al., 1992; KUCHAN et al., 1993). Sowohl Nitropräparate (*NO*) als auch atriales natriuretisches Peptid (ANP) und Prostacyclin hemmen die ET-1-Synthese über die „second messenger“ *cGMP* bzw. *cAMP* (GRAY et al., 1996). ET-1 induziert über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor die kalziumabhängige endotheliale *NO*-Synthase (eNOS), steigert damit die Synthese von *NO* und trägt so wahrscheinlich selbst lokal zur negativen Rückkopplung bei (WARNER et al., 1993).

### Präpro-ET-1



**Abb. 1: Biosynthese des ET-1 (beim Schwein).** Nach der Spaltung des Präpro-ET-1 durch eine spezifische Endopeptidase wird Big-ET-1 durch das ECE zu reifem ET-1 umgewandelt.

Ausgangsprodukt der Synthese des ET-1 beim Schwein ist das 203 Aminosäuren lange Präpro-ET-1 (siehe Abb. 1). Beim Menschen verläuft die Synthese analog, beginnt aber mit einem 212 Aminosäuren langen Präpro-ET-1 (ITO et al., 1988). Eine basenspezifische Endopeptidase spaltet das Präpro-ET-1 zu Proendothelin-1 (Pro-ET-1) (YANAGISAWA et al., 1988). Dieses wird auch Big-Endothelin-1 (Big-ET-1) genannt und besteht beim Menschen aus 38, bei Schwein (YANAGISAWA et al., 1988), Rind und Ratte aus 39 Aminosäuren. Zur biologischen Aktivierung ist die Spaltung durch ein *endothelin converting enzyme* (ECE) zu reifem ET-1 notwendig, da ET-1 140fach stärker vasokonstriktorisch wirkt als Big-ET-1 (KIMURA et al., 1989). Die höhere Plasmakonzentration von Big-ET-1 im Vergleich zu reifem ET-1 im Plasma (SUZUKI et al., 1989) spricht für eine vorwiegend periphere Konversion, während aber auch intrazellulär reifes ET-1 nachgewiesen werden kann (HOWARD et al., 1992).

Es sind verschiedene ECE bekannt. Das physiologisch bedeutsamste ist anscheinend eine membrangebundene neutrale Metallopeptidase, die Big-ET-1 durch Spaltung bei  $\text{Trp}^{21}\text{-Val}^{22}$  aktiviert (YANAGISAWA et al., 1988; OKADA et al., 1990; XU et al., 1994). Großes Interesse richtet sich zur Zeit auf die Möglichkeit, über ECE-Antagonisten analog den *angiotensin converting enzyme* (ACE)-Hemmern medikamentös in das Endothelinsystem einzugreifen.

YANAGISAWA et al. (1988) vermuteten, daß ET-1 bei Bedarf *de novo* gebildet werden muß, da eine ET-1-Produktion in Zellkulturen frühestens 30 min nach Stimulation nachweisbar war. Granula mit ET-1-Immunreaktivität konnten bisher im Hypophysenhinterlappen nachgewiesen werden (YOSHIZAWA et al., 1990). Inzwischen haben außerdem HARRISON et al. (1995) sekretorische Vesikel in Rinderendothelzellen identifizieren können. Dies paßt zu der Beobachtung, daß beim Menschen eine Versiebenfachung der ET-1-Plasmakonzentration in 2 min erzielt werden kann (FYHRQUIST et al., 1990).

ET-1 hat nach intravenöser Applikation eine Halbwertszeit von unter 1 min in der Ratte (ÄNGGÅRD et al., 1989) und von unter 5 min im Menschen (WEITZBERG et al., 1991). Der Abbau erfolgt über schnelle Internalisierung der ET-Rezeptorkomplexe sowie Metabolisierung in Lunge und Niere (DUPUIS et al., 1996).

#### **1.1.4 Vorkommen und Wirkung des Endothelins**

Big-ET-1, ET-1 und ET-3 sind in Konzentrationen im picomolaren Bereich im Plasma vorhanden (BATTISTINI et al., 1993a). Dies ist eine Größenordnung, die wahrscheinlich nicht ausreicht, um direkte Effekte, beispielsweise am Gefäßtonus zu erzielen. ET-1 wird eher als ein para- und autokriner Mediator denn als endokrines Hormon angesehen. In der Tat wird ET-1 von Endothelzellen stärker abluminal an die umgebenden glatten Muskelzellen abgegeben als in das Gefäßlumen (YOSHIMOTO et al., 1991; WAGNER et al., 1992). Als Marker der allgemeinen ET-Sekretion kann die Bestimmung des zirkulierenden ET trotzdem sinnvoll sein und in pathologischen Zuständen ist auch ein direkter Effekt des peripheren ET möglich (LERMAN et al., 1991). Grundsätzlich ist jedoch die Bestimmung der lokalen Gewebe-ET-Aktivität aussagekräftiger.

Die ursprüngliche Annahme, ET sei nur im Endothel zu finden, hat sich nicht bestätigt. Unter Verwendung von immunzytochemischen, immunchemischen, und in-situ-Hybridisierungs-Techniken gelang es, ET und die entsprechende mRNA in einer Vielzahl von Geweben nachzuweisen.

**Tabelle 3: ET-1-Lokalisation in Organen und Geweben.** Auswahl von Strukturen in denen mit unterschiedlichen Methoden ET-1 oder entsprechende mRNA nachgewiesen werden konnte. In Klammern die untersuchte Spezies: M=Mensch, R=Ratte, S=Schwein.

<b>Nicht-Endothelzellen</b>		<b>Tumorzellen (<i>in vitro</i>)</b>	
Gefäßmuskelzellen (M)	KANSE et al., 1991; RESINK et al., 1990a	11 Mamma-, Pankreas- und Kolon-CA-Linien	KUSUHARA et al., 1990
Herzmuskelzellen (R)	SUZUKI et al., 1993	HeLa, HEp-2 (M)	SHICHIRI et al., 1991a,b
Endometrium (M)	ECONOMOS et al., 1992b; O'REILLY et al., 1992	Mamma-CA (M)	YAMASHITA et al., 1991; SCHREY et al., 1992
Plazenta (M)	BENIGNI et al., 1991a,b	Endometrium-CA (M)	PEKONEN et al., 1992; ECONOMOS et al., '92a
Nebenschilddrüse (M)	EGUCHI et al., 1992b	Prostata-CA (M)	NELSON et al., 1995
Neurone (M)	GIAID et al., 1989; GIAID et al., 1991	Ovarial-CA (M)	MORAITIS et al., 1997
Hypothalamus (M)	LEE et al., 1990	<i>Morris-Hepatom-7777</i> (R) eigene Ergebnisse	
Niere (S)	PERNOW et al., 1989	<b>Tumoren (<i>in vivo</i>)</b>	
Herz, Lunge, Pkr., Milz (M)	BLOCH et al., 1989a	Lungen-CA (M)	GIAID et al., 1990
<b>Endothelzellen</b>		Hepatozelluläres-CA (M)	ISHIBASHI et al., 1993; KAR et al., 1995
Schweineaorta (S)	YANAGISAWA et al., 1988	Meningeome (M)	PAGOTTO et al., 1995
Gehirnmikrogefäße (S)	YOSHIMOTO et al., 1990	Prostata-CA (M)	NELSON et al., 1996
Corpus Cavernosum (M)	S. DE TEJADA et al., 1991	Kolorektales-CA (M)	ASHAM et al., 1998
Zahnpulpa (M)	CASASCO et al., 1991	<i>Morris-Hepatom-7777</i> (R) eigene Ergebnisse	
Mesenterialarterie (R)	DOHI et al., 1992		

ET-1 ist u.a. in Blutgefäßen, Herz, Lunge, Pankreas, Milz, Niere und ZNS, aber auch in Tumorzelllinien und Tumoren *in vivo* vorhanden (siehe Tabelle 3). Das von den Endothelzellen produzierte ET-1 ist im Gefäßbereich die wichtigste Isoform (BLOCH et al., 1989a; INOUE et al., 1989b). In der glatten Gefäßmuskulatur wird im Vergleich zu Endothelzellen *in vitro* nur etwa 100fach weniger ET-1 synthetisiert (KANSE et al., 1991; RESINK et al., 1990a), jedoch könnte aufgrund der größeren Masse an Gefäßmuskelzellen diese Quelle trotzdem funktionelle Bedeutung besitzen.

ET-2 ist im menschlichen Plasma nicht nachweisbar (SUZUKI et al., 1989), kommt aber u.a. in Niere und Darm vor, ohne daß seine funktionelle Bedeutung geklärt wäre.

ET-3 wird hauptsächlich im Darm und ZNS exprimiert (MATSUMOTO et al., 1989; SHINMI et al., 1989), nicht dagegen im Endothel oder in Herzmuskelzellen (HOWARD et al., 1992).

Die drei Isoformen des ET zeigen eine große Vielfalt an Wirkungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im tierischen und menschlichen Organismus:

In großen Teilen des Gefäßsystems wirken besonders ET-1 und ET-2 nach einer vorübergehenden Dilatation konstringierend (INOUE et al., 1989a; COCKS et al., 1989). Diese Wirkungen werden u.a. über NO (GARDINER et al., 1990; DOUGLAS et al., 1990) und Prostacyclin (DE NUCCI et al., 1988) autokrin reguliert. Die Gefäßkonstriktion führt nach Bolusgabe von ET-1 in überphysiologischen Dosen zu einer mehr als 60 min anhaltenden Blutdruckerhöhung (INOUE et al., 1989a).

Am Herzen sind bei niedrigen Dosen von ET-1 positiv chronotrope (ISHIKAWA et al., 1988a) und inotrope (ISHIKAWA et al., 1988b) Effekte zu beobachten. Die Koronarien sind neben den Nierengefäßen das auf ET am empfindlichsten reagierende Widerstandsgefäßbett (CLOZEL et al., 1989). Steigende Dosen führen durch Koronarkonstriktion und daraus folgende Ischämien (KURIHARA et al., 1989b) und Arrhythmien (EZRA et al., 1989) zu einem Absinken der Herzleistung.

An der Niere führt die Konstriktion sowohl der efferenten als auch der afferenten Arteriolen (EDWARDS et al., 1990) zu einem Abfall des renalen Plasmaflusses und der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (FIRTH et al., 1988). Angiotensin II konstringiert dagegen nur die efferenten Arteriolen. Trotz der verminderten GFR steigt die Natrium-Exkretion durch geringe ET-1-Dosen an (MARSDEN et al., 1994), während allerdings höhere Dosen auch zu Natrium-Retention führen können (LOPEZ-FARRE et al., 1989).

Im ZNS konnten an vielen Strukturen ET-Bindungsstellen nachgewiesen werden (DAVENPORT et al., 1989). Neben arterieller Konstriktion ist durch am Hypothalamus topisch appliziertes ET-3 ein Effekt auf die Salz-Wasser-Bilanz (Anstieg des ADH) und eine Herabsetzung des Durstempfindens zu erzielen (SAMSON et al., 1991).

Die Effekte auf das endokrine System sind vielfältig. U.a. beobachtet man durch ET komplexe Effekte auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Bei Tieren erhöht ET-1 die Serumkonzentrationen von ADH, ACTH, Aldosteron, Kortisol, Renin und Katecholaminen. (NAKAMOTO et al., 1989).

Eine Konstriktion der glatten Muskulatur bewirkt ET u.a. auch im Myometrium, im Ductus deferens und in den Bronchien (LAGENTE et al., 1989).

Eine Beteiligung von ET an der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten ist wahrscheinlich. Relativ starke experimentelle Evidenzen dafür gibt es u.a. bei folgenden Erkrankungen: Myokardinfarkt, Koronarspasmen, chronische Herzinsuffizienz, akutes Nierenversagen, Ciclosporinnephrotoxizität, Raynaud-Phänomen, Asthma, primäre pulmonale Hypertension, Subarachnoidalblutung (ORTEGA-MATEO et al., 1997).

### 1.1.5 Endothelin als Wachstumsfaktor

Neben den oben genannten Wirkungen haben die Endotheline auch einen wichtigen Stellenwert als Faktoren zur Stimulation und Regulierung von Wachstum, Differenzierung und Entwicklung.

In ET-1-*knockout*-Experimenten an Mäusen zeigten sich kraniofaziale und kardiovaskuläre Mißbildungen, die bei homozygoten Tieren nicht mit dem Leben vereinbar sind (KURIHARA et al., 1994; KURIHARA et al., 1995). Interessanterweise konnten diese Mißbildungen ebenfalls bei Teratogenitätsstudien mit ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten hervorgerufen werden, so daß eine ET<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte ET-1-Wirkung in der Fetalentwicklung vermutet werden kann. Auch eine Mitverursachung von kongenitalen Krankheitsbildern wie dem Pierre-Robin- oder Treacher-Collins-Syndrom durch Anomalien im ET-1/ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Bereich wird postuliert (ONG, 1996).

An der Entwicklung von Zellen der Neuralleiste und an deren Wanderung in die Peripherie scheint das Endothelinsystem ebenfalls beteiligt zu sein. Ein *Knockout* des ET-3- oder des ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Gens führt zu Mäusen mit aganglionärem Megacolon congenitum, ähnlich der menschlichen Hirschsprung-Erkrankung. Außerdem fehlen bei diesen Tieren regional epidermale Melanozyten (BAYNASH et al., 1994; HOSODA et al., 1994).

Erst kürzlich konnte von YANAGISAWA et al. (1998) an Mäusen gezeigt werden, daß eine Schädigung im ECE-1-Gen zu einer Kombination der beschriebenen Mißbildungen führt, die bei isoliertem ET-1-*knockout* oder ET<sub>A</sub>-Blockade einerseits sowie *Knockout* des ET-3- oder ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Gens andererseits auftreten. Es scheint also sowohl eine ECE-1/ET-1/ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Achse als auch eine ECE-1/ET-3/ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Achse für die frühe fetale Entwicklung und Differenzierung *in vivo* von Bedeutung zu sein.

Weiterhin wurde ein proliferativer Effekt von ET-1 auf eine Vielzahl verschiedenster Zelltypen *in vitro* nachgewiesen (wenn nicht anders angegeben Referenzen bei: BATTISTINI et al., 1993b):

- Glatte Gefäßmuskelzellen: aus Ratten- und Kaninchenaorta, Schweine- und Rinderpulmonararterie, Bronchien (PANETTIERI et al., 1996; WHELCHER et al., 1997), klonierte Gefäßmuskelzellen, Rattenkardiomyozyten.
- Fibroblasten: Swiss 3T3- und Rat-1-Fibroblasten, Rattennierenfibroblasten, humane dermale- und Bruststromafibroblasten.

- Sonstige Zellen: Rattenmesangiumzellen, Rattenosteoblasten, astrozytische Rattenglia, Rindergehirn-Kapillarendothelzellen, humane Melanozyten, humane Keratinozyten (BAGNATO et al., 1995), Zona-glomerulosa-Zellen der Ratte (MAZZOCCI et al., 1997), Bronchialepithelzellen (MURLAS et al., 1995).

Nicht nur ET-1, sondern auch die anderen ET-Isoformen können proliferationsfördernd wirken. ET-1 und ET-2 sind in etwa gleich stark, während ET-3 und Big-ET-1 eine deutlich schwächere Wirkung zeigen.

Auch für benigne und maligne Neoplasien scheint das Endothelinsystem eine Bedeutung zu haben. ET-1-Produktion oder Speicherung konnte in vielen Krebszelllinien *in vitro* bzw. in Karzinomen *in vivo* nachgewiesen werden (*siehe Tabelle 3*)

U.a. folgende neoplastische bzw. Karzinomzellen lassen sich durch ET-1 in ihrer Proliferation stimulieren:

- C<sub>6</sub>-Gliomzellen und zerebelläre Astroglia (MACCUMBER et al., 1990)
- HeLa- und HEP-2-Zellen (SHICHIRI et al., 1991b)
- Humane Meningeomzellen (KITAGAWA et al., 1994; PAGOTTO et al., 1995)
- Humane Prostatakarzinomzellen (NELSON et al., 1995; NELSON et al., 1996)
- Humane primäre und metastatische Melanomzellen (KIKUCHI et al., 1996)
- Humane Ovarialkarzinomzellen (MORAITIS et al., 1997)

Bis auf die C<sub>6</sub>-Gliomzellen wird in allen diesen Zellen gleichzeitig ET-1 gebildet, d.h. es kann ein autokriner Stimulationsmechanismus vermutet werden.

Auch die entsprechenden ET-Rezeptoren sind auf einigen der genannten Zellen bzw. in Tumoren beschrieben: u.a. auf glatten Gefäßmuskelzellen (HAHN et al., 1990), Swiss 3T3-Fibroblasten (TAKUWA et al., 1989), Rattenkardiomyozyten (HIRATA et al., 1989), Gliomzellen (KURIHARA et al., 1990), HeLa- und HEP-2-Zellen (SHICHIRI et al., 1991b), Meningeomzellen (KITAGAWA et al., 1994; PAGOTTO et al., 1995), Prostatakarzinomzellen (NELSON et al., 1996), Melanomzellen (KIKUCHI et al., 1996) und Ovarialkarzinomzellen (MORAITIS et al., 1997).

Auf Swiss 3T3-Fibroblasten ist die Zahl der Rezeptoren für Endothelin höher als die der Rezeptoren für jeden anderen Wachstumsfaktor wie z.B. *platelet derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF) oder EGF (KUSUHARA et al., 1989).



In vielen Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, daß ET-1 meist nicht isoliert für sich, sondern in funktioneller Gemeinsamkeit mit anderen Wachstumsfaktoren wirkt, deren Gegenwart in lebenden Systemen selten völlig vermeidbar ist. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser teils überadditiven Wirkungssteigerung könnte durch Interaktionen verschiedener Signaltransduktionskaskaden erklärt werden (BATTISTINI et al., 1993b). So zeigen beispielsweise ET-1 und *Insulin-like growth factor* (IGF) eine proliferationssteigernde Wirkung auf humane Bruststromafibroblasten. Bei Einzelgabe beträgt die Proliferationssteigerung 35% bzw. 71% gegenüber Kontrollen. Bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen verstärkt sich dieser Effekt auf 907% (SCHREY et al., 1992).

Die aus *Tabelle 2* ersichtliche Fähigkeit einiger Wachstumsfaktoren, eine ET-Synthese zu induzieren, gilt auch für Karzinomzellen. Dexamethason, Insulin, EGF und Bombesin stimulieren die ET-Freisetzung aus humanen Mamma-CA-Zellen (SCHREY et al., 1992).

Nach Ergebnissen von MATTINGLY (1992) können auch Onkogenprodukte eine Steigerung der proliferativen Wirkung des ET-1 bewirken. Das Produkt (*pp60v-src*) des *v-src*-Onkogens verstärkt demnach die Akkumulation der durch ET-1 allein induzierten Mitogene *Inositol(1,4,5)P<sub>3</sub>* und  $Ca^{2+}$  um das sechs bzw. dreifache in Rat-1-Fibroblasten. Dieser Befund könnte für die Bewertung des Stellenwertes von ET-1 als Wachstumsfaktor bei Neoplasien von Bedeutung sein. Andererseits reguliert ET-1 seinerseits auch die Transkription verschiedener Onkogene, so daß sich ein komplexes System sich selbst regulierender Regelkreise ergibt.

Nicht in jedem Fall wirkt ET-1 proliferationsfördernd. Ganz im Gegenteil hemmt ET-1 z.B. die Proliferation von *Ito*-Zellen der Leber (MALLAT et al., 1995). Auch in diesem Fall wird ET-1 von den Zellen selbst synthetisiert (HOUSSET et al., 1993), so daß eine Funktion als autokrines Hormon erwogen werden muß.

Im Rahmen der Rolle des ET-1 als Wachstumsfaktor wird neben dem proliferationssteigernden Effekt in letzter Zeit zunehmend die Wirkung von ET-1 auf Apoptoseprozesse diskutiert. Im Vordergrund steht dabei die Beobachtung einer ET<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten Abschwächung von Apoptose in Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten (WU-WONG et al., 1997; SHICHIRI et al., 1998) und damit ET-1 als „*apoptosis survival factor*“. Abweichend davon wurde bei anderen Zellen eine entsprechende Wirkung über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor beschrieben (SHICHIRI et al., 1997), ein apoptosefördernder Effekt beobachtet (SHARIFI et al., 1997) bzw. bei Prostatakarzinomzellen keinerlei Beeinflussung der Apoptoserate gesehen (NELSON et al., 1996).

*In vivo* wurden bisher bei Patienten mit Prostata-CA (NELSON et al., 1995), hepatozellulärem CA (HCC) (ISHIBASHI et al., 1993; NAKAMUTA et al., 1993; MATSUMOTO et al., 1994) und kolorektalem CA (ASHAM et al., 1998) erhöhte ET-1-Plasmakonzentrationen gemessen. Während zwar für alle genannten Tumoren eine ET-1-Produktion nachgewiesen werden konnte, bleibt es unklar, ob die peripher erhöhten Hormonkonzentrationen allein durch die Produktion aus Tumorzellen stammen oder es sich um ein Epiphänomen, eine unspezifische Antwort des Wirtsorganismus handelt, wie sie auch bei vielen anderen Krankheitsbildern zu beobachten ist (z.B. bei Leberzirrhose, Hepatorenalem Syndrom, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Sepsis u.a.) (NELSON et al., 1995).

Es bleibt zu klären, welche Relevanz die erhöhten ET-1-Konzentrationen und das ET-System im allgemeinen für Wachstum und Differenzierung von Tumoren und umgebendem Stroma *in vivo* wirklich haben und welche therapeutischen Schlüsse daraus in Zukunft gezogen werden können.

### 1.1.6 Die Endothelinrezeptoren

Schon früh schloß man aufgrund divergierender pharmakologischer und funktioneller Daten zwischen den ET-Isoeptiden auf die Existenz verschiedener Rezeptorsubtypen (INOUE et al., 1989a). Drei ET-Rezeptoren sind bisher bekannt: der ET<sub>A</sub>-, ET<sub>B</sub>- und ET<sub>C</sub>-Rezeptor. Allerdings könnte diese zur Zeit gebräuchliche Klassifikation aufgrund teilweise widersprüchlicher Befunde in Zukunft durch eine weitere Aufteilung in Untergruppen verfeinert oder durch eine nach anderen Kriterien ausgerichtete Klassifikation ersetzt werden (BAX et al., 1994).

Nach der Erstbeschreibung der Klonierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors aus Rinderlungen-cDNA (ARAI et al., 1990) wurde auch der zu 94% sequenzzhomologe humane Rezeptor kloniert. Er besteht aus 427 Aminosäuren und hat eine hohe Affinität zu ET-1, während ET-2 etwas und ET-3 etwa 1000fach schwächer bindet (ET<sub>A</sub>-Rezeptor: ET-1>ET-2>>ET-3)(HOSODA et al., 1991). Seine mRNA wird im Menschen vor allem in glatter Gefäßmuskulatur, Herz (MOLENAAR et al., 1993), Lunge, Kolon und Plazenta nachgewiesen, während keine entsprechende mRNA in Endothelzellen und Leber zu finden ist (HOSODA et al., 1991). Dagegen wird in Rattenleber sowohl der ET<sub>A</sub>- als auch der ET<sub>B</sub>-Rezeptor exprimiert (SERRADEIL-LE GAL et al., 1991; JOUINEAUX et al., 1994).

Der ET<sub>B</sub>-Rezeptor wurde zunächst aus Rattenlungen-cDNA, (SAKURAI et al., 1990) und schließlich aus humaner DNA kloniert (NAKAMUTA et al., 1991; OGAWA et al., 1991). Er hat 442 Aminosäuren und bindet unselektiv alle drei ET-Isopeptide mit gleicher

Affinität (ET<sub>B</sub>-Rezeptor: ET-1=ET-2=ET-3)(SAKAMOTO et al., 1991). Er kommt in Endothelzellen, im ZNS, aber auch in Lunge und Niere vor (OGAWA et al., 1991). Die postulierte Subklassifizierung in ET<sub>B1</sub>- und ET<sub>B2</sub>-Rezeptor kann derzeit auf molekularer Ebene noch nicht bestätigt werden (BAX et al., 1994).

Der ET<sub>C</sub>-Rezeptor wurde bisher nicht in Säugern, sondern lediglich in der Froschart *Xenopus laevis* nachgewiesen. Er hat eine besondere Affinität zu ET-3 (ET<sub>C</sub>-Rezeptor: ET-1=ET-2<<ET-3) (KARNE et al., 1993).

In vielen Spezies wurden ET-Rezeptoren mit beachtlichen Sequenzhomologien gefunden. Zwischen ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptor einer Spezies liegt die Übereinstimmung bei ca. 50% (ARAI et al., 1993). Gleiche Subtypen verschiedener Spezies gleichen sich zu ca. 90% (HAENDLER et al., 1992). Die relativen Molmassen liegen zwischen 45.000 und 50.000.

ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der rhodopsinartigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben hydrophoben transmembranären Helices, einem extrazellulären N- und einem intrazellulären C-Terminus sowie jeweils drei extra- und intrazellulären Loops (BIRNBAUMER et al., 1990). Weiterhin enthalten beide Rezeptortypen je zwei Glykosylierungsstellen am N-Terminus (Asn 29, Asn 62), 5 Cysteinreste im C-terminalen Bereich in der Nähe des 7. Loops sowie einige Serinreste und damit mögliche Phosphorylierungsstellen in der zytoplasmatischen Domäne.

Nach erfolgter Bindung von ET an den Rezeptor ist die Abdissoziation extrem langsam (HIRATA et al., 1988). Statt dessen folgt eine schnelle Internalisierung des ET-Rezeptor-Komplexes (RESINK et al., 1990b).

Es gibt einen autokrinen *Feedback*mechanismus, welcher die ET-Rezeptor-Expression über die Verfügbarkeit von ET-1 reguliert (CLOZEL et al., 1993).

### 1.1.7 Die Signaltransduktion

Viele Bereiche der ET-Signaltransduktionskaskade, insbesondere komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen parallel ablaufenden intrazellulären Informationsketten, konnten noch nicht ausreichend geklärt werden. Relativ unstrittig ist die Aktivierung von Phospholipase C über die G-Protein-gekoppelten heptahelikalen ET-Rezeptoren. Dieses führt zur Spaltung von *Phosphatidylinositol* in *Inositoltrisphosphat* und *Diacylglycerol* (RUBANYI et al., 1994). Das zytosolische *Inositoltrisphosphat* bewirkt einen schnellen Anstieg des Kalziums durch Öffnung von intrazellulären Speichern (KASUYA et al., 1989). Ein verzögerter Kalziumanstieg folgt durch Öffnung von Kanälen in der

äußeren Zellmembran. Die Rolle des Kalziums wird als zentral in der Regulierung der ET-1-abhängigen mitogenen Effekte betrachtet (BATTISTINI et al., 1993b). Das membrangebundene *Diacylglycerol* aktiviert die Proteinkinase C (GRIENDLING et al., 1989), welche einerseits den kontraktilem Apparat für Kalzium sensibilisiert und zu einem Anstieg des intrazellulären pH-Werts führt (SIMONSON et al., 1989). Andererseits wird die verstärkte Transkription wachstumsfördernder Gene (*c-fos*, *c-myc*, *c-jun*) (KOMURO et al., 1988; SIMONSON et al., 1992) über Proteinkinase C angenommen (SIMONSON et al., 1989). Die mitogene Wirkung des ET-1 wird außerdem der Phosphorylierung von Tyrosinresten durch eine Proteintyrosinkinase (SIMONSON et al., 1993) sowie der Aktivierung zweier mitogenaktivierter Proteinkinasen (MAPK) zugeschrieben (ORTEGA-MATEO et al., 1997; BOGOYEVITCH et al., 1994; WANG et al., 1994).

Beispielsweise wurde an Ovarialkarzinomzellen gezeigt, daß ET-1 über den ET<sub>A</sub>-Rezeptor eine schnelle *c-fos*-Expression auslöst. Die mitogene Wirkung wird sowohl über Proteinkinase C als auch über eine Proteintyrosinkinase (welche wiederum MAPKs phosphoryliert) auf zwei getrennten, aber additiv interagierenden *Pathways* erzielt (BAGNATO et al., 1997). BATTISTINI et al. (1993b) vermuten einen Proteinkinase C-unabhängigen, kurzfristigen mitogenen Effekt über schnelle Genexpression (*c-fos*, *c-jun*) neben einer längerfristigen Proteinkinase C-abhängigen Wirkung (MULDOON et al., 1990).

### 1.1.8 Die Endothelinrezeptorantagonisten

Wie schon erwähnt, können Synthese und Freisetzung sowie diverse Wirkungen der Endotheline durch Substanzen wie NO, ANP, Prostacyclin, Kalziumkanalantagonisten und auch Substanz P gehemmt werden. Diese Effekte beruhen auf unterschiedlichen, teils nicht bekannten Übertragungswegen, die entweder schon die Bildung und Freisetzung des ET verhindern oder erst auf einer späten Stufe in die Signaltransduktionskaskade des ET eingreifen.

Um Aufschluß über die Bedeutung des ET-Systems sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Zuständen zu bekommen, benötigt man die Möglichkeit einer klar definierten Einflußnahme auf ET-Rezeptorebene. Durch die Entwicklung von selektiv wirksamen ET-Rezeptoragonisten und -antagonisten, können nun in verschiedenen Modellen gezielt ET<sub>A</sub>- oder ET<sub>B</sub>-Rezeptoren stimuliert bzw. geblockt werden, um pathophysiologische Zusammenhänge genauer zu beschreiben und evtl. therapeutische Möglichkeiten abzuleiten (*siehe Tabelle 4*). Die meisten therapeutischen Informationen

sind derzeit aus Tiermodellen bekannt. In bezug auf humane Krankheiten beschränken sich Erkenntnisse über Wirkungen von ET-Rezeptorantagonisten im wesentlichen auf Hypertension (WARNER et al., 1996) und Myokardinsuffizienz (KIOWSKI et al., 1995).

**Tabelle 4: Agonisten und Antagonisten der ET-Rezeptoren.** In Klammern: P=Peptid, NP=Nicht-Peptid. Referenzen: *siehe Text* oder STJERNQUIST, 1998.

<b>ET<sub>A</sub>-Rezeptor-agonisten</b>		<b>ET<sub>A</sub>-Rezeptor-antagonisten</b>	BQ 123 (P) FR 139317 (P) 50-235 (NP) BMS 182874 (NP) PD 156707 (NP) LU 135252 (NP) A 127722
<b>ET<sub>B</sub>-Rezeptor-agonisten</b>	ET-3 STX S6c [Ala1,3,11,15]-ET-1	<b>ET<sub>B</sub>-Rezeptor-antagonisten</b>	IRL 1038 (P) BQ 788 (P)
<b>Kombinierte ET<sub>A/B</sub>-Rezeptor-agonisten</b>	ET-1 ET-2 STX S6b	<b>Kombinierte ET<sub>A/B</sub>-Rezeptor-antagonisten</b>	Ro 47-0203/Bosentan (NP) Ro 46-2005 (NP) SB 217242 (NP) PD 142893 (P) 50-235 (NP) Tak-044 (P) LU 302872 (NP)

Die ersten ET-Rezeptorantagonisten waren Peptide. 1991 wurde *IRL 1038* als erster ET<sub>B</sub>-selektiver Antagonist entwickelt (URADE et al., 1992). Versuche, einen ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten zu finden, führten zur Isolierung von *BQ 123* aus dem Fermentationsprodukt des *Streptomyces misakiensis*. *BQ 123* ist inzwischen eine Standardsubstanz zur ET-Rezeptor-Identifikation (IHARA et al., 1992).

Ein Problem bei peptidischen Antagonisten, genau wie bei ET und Sarafotoxinen, ist die ausschließlich parenterale Applikationsmöglichkeit. Dies führte zur Entwicklung von Nicht-Peptid-ET-Rezeptorantagonisten wie der Substanz *50-235* (ET<sub>A</sub>-selektiv) aus *Myrica cerifera* (MIHARA et al., 1993) und dem wohl bekanntesten nicht-peptidischen kombinierten ET<sub>A/B</sub>-Rezeptorantagonisten *Ro 47-0203* oder *Bosentan* (CLOZEL et al., 1994). Von diesem stammen die ersten klinischen Erfahrungen bei Herzinsuffizienz (KIOWSKI et al., 1995).

Eine neue Klasse nicht-peptidischer, oral applizierbarer, lang wirksamer ET-Rezeptorantagonisten wurde erst kürzlich durch Screening einer chemischen Bibliothek gefunden (RIECHERS et al., 1996). Die Ausgangssubstanz war ursprünglich als Herbizid entwickelt worden. Die geeignetsten Vertreter sind der ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist

*LU 127043* (2-[(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl)oxy]-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionsäure) bzw. sein (+)S-Enantiomer *LU 135252* (RIECHERS et al., 1996) sowie der kombinierte ET-Antagonist *LU 224332* bzw. sein aktives (+)S-Enantiomer *LU 302872* ([S-2-(4,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)oxy]-3-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethoxy]-3,3-diphenyl-propionsäure) (RASCHAK et al., 1998). *LU 135252* hat eine weit höhere Affinität zum ET<sub>A</sub>-Rezeptor als *BQ 123* (siehe Tabelle 5) und verhindert nach oraler Gabe noch nach acht Stunden den ET-1-induzierten plötzlichen Tod bei Ratten (RASCHAK et al., 1995). Auch *LU 302872* zeigt gute orale Effektivität, es hat eine ausgewogenere Rezeptorwirkung als *Bosentan* und bewirkt schon in Dosierungen von 10 mg/kg Körpergewicht bei Ratten eine Antagonisierung sowohl ET<sub>A</sub>- als auch ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelter Vorgänge (RASCHAK et al., 1998).

**Tabelle 5: Rezeptoraffinität und -selektivität einiger ET-Rezeptorantagonisten.** Affinität von ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>: K<sub>i</sub> in nmol/l. Selektivität ET<sub>B</sub>/ET<sub>A</sub>: ohne Einheit. (RASCHAK et al., 1995; RASCHAK et al., 1998)

Substanz	ET <sub>A</sub>	ET <sub>B</sub>	ET <sub>B</sub> /ET <sub>A</sub>
<b>BQ 123</b>	19	3800	200
<b>LU 135252</b>	1,4	184	131
<b>Bosentan</b>	3,4	29,6	8,7
<b>LU 302872</b>	2,2	5,8	2,6

An Gefäßmuskelzellen der Ratte (EGUCHI et al., 1992a; OHLSTEIN et al., 1992; GUO et al., 1996), humanen Gefäßmuskelzellen (ZAMORA et al., 1993), C<sub>6</sub>-Gliomzellen (ŠEDO et al., 1993), humanen Meningeomzellen (PAGOTTO et al., 1995) und humanen Ovarialkarzinomzellen (MORAITIS et al., 1997) antagonisiert *BQ 123* eine durch ET-1 hervorgerufene Proliferation. Bei den Ovarialkarzinomzellen hemmt *BQ 123* auch die unter den entsprechenden Bedingungen bestehende, nicht durch ET-1 exogen stimulierte Basisproliferation (MORAITIS et al., 1997). In Prostatazellen kann eine ET-1-induzierte Proliferation durch den ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten *A 127722* inhibiert werden (NELSON et al., 1996).

*In vivo* konnte nach Ballonangioplastie an Rattenkarotiden eine Hemmung der Neointimabildung durch orale Gabe von *LU 135252* erreicht werden (MÜNTER et al., 1996; STUMPF et al., 1997).

## 1.2 Das *Morris*-Hepatom

Die *Morris*-Hepatome sind eine Serie von über 50 verschiedenen Linien transplantierbarer Tumoren der Leber. Sie wurden in den 50er und 60er Jahren im Labor von Dr. H. P. Morris (Howard University, Washington D.C., USA) an Ratten chemisch induziert. Das Ziel war es, Tumoren mit „*minimal deviations*“, also möglichst leberähnlichem Aufbau zu erzeugen, um den Karzinogenese-prozeß, biologische und biochemische Eigenschaften sowie Wachstumsverhalten von maligne entartetem Gewebe studieren zu können (MORRIS, 1965; MORRIS et al., 1968).

Das *Morris*-Hepatom(MH)-7777 wurde bei weiblichen Buffalo-Ratten durch Gabe des langsam wirkenden Karzinogens *N*-2-Fluorenylphthalamsäure induziert (MORRIS, 1965). Über fokale, exzessiv Glykogen speichernde klarzellige und azidophile Läsionen und andere Vorstadien, wie gemischtzellige Herde und Noduli, erfolgt die Entwicklung eines vorwiegend basophilen hepatozellulären Karzinoms (BANNASCH et al., 1980; BANNASCH et al., 1989; BANNASCH, 1996). Die Substanz wurde zehn Monate lang kontinuierlich verabreicht und der Tumor vier Monate später entnommen. Histologisch handelte es sich zunächst um ein trabekuläres, gut differenziertes Karzinom (MORRIS, 1965). Über die letzten 30 Jahre nahm die Wachstumsrate des MH-7777 zu und schon 1979 wurde das MH-7777 als schlecht differenziertes Hepatom beschrieben (MORRIS et al., 1979). Nach ca. 300 Generationen wurde ein entdifferenzierter Tumor mit multiplen nekrotischen Herden, Tumorzellen verschiedener Größe, basophilem Zytoplasma, pleomorphen, großen Zellkernen mit prominenten Nucleoli, Verlust der Sinusoidalarchitektur und fehlenden Kupffer-Sternzellen beschrieben (HOCHER et al., 1994). Der relative hämorrhagische oder nekrotische zentrale Tumoranteil ist unabhängig von der Tumorgroße. Der vitale Anteil wird mit konstant 57 ( $\pm$  13) % angegeben (LINDER-HOROWITZ et al., 1969). Die zunehmende Entdifferenzierung des Hepatoms über die Generationen könnte auf Selektion von ligandenunabhängiger Tyrosinkinaseaktivität zurückzuführen sein, welche wiederum Ausdruck verstärkter Expression des *v-erb B* Onkogens sein könnte (HOCHER et al., 1994).

Das MH-7777 kann nur auf Buffalo-Ratten transplantiert werden und hat eine Angehrate von 90-100% (MORRIS, 1965). Es wird üblicherweise beidseitig in die Oberschenkelmuskulatur der Tiere injiziert und führt im Laufe von vier bis sechs Wochen zu Tumorkachexie, Muskelproteinkatabolismus (LINDER-HOROWITZ et al., 1969;

LE BRICON et al., 1996) und schließlich zum Tod des Wirts. Lungenmetastasen und Mikrometastasen in der Leber werden beschrieben.

Wie viele andere maligne Neoplasien sind auch einige *Morris*-Hepatome hormonabhängig. Gezeigt wurden Abhängigkeiten von Thyroxin (MISHKIN et al., 1981; ERDSTEIN et al., 1984), Prolaktin (POLLACK et al., 1982) und Testosteron (ERDSTEIN et al., 1989). Zur Relevanz des Endothelins gibt es bisher keinerlei Erkenntnisse.

In der vorliegenden Studie wird mit einem experimentellen Lebertumor gearbeitet. Experimentelle Tumoren in Tiermodellen liefern niemals eine exakte Widerspiegelung der Situation in spontan auftretenden humanen Tumoren. Trotzdem stellen sie wertvolle Modelle zur Erforschung und Verifizierung grundlegender Prinzipien dar. Die aus derartigen Studien gewonnenen Informationen können genutzt werden, um neue Herangehensweisen zur Therapie menschlicher Erkrankungen zu entwickeln.



### 1.3 Fragestellung der Arbeit

Endothelin hat neben der zuerst beschriebenen vasokonstriktiven Eigenschaft auch mitogene Wirkung auf eine Vielzahl von Zellen (BATTISTINI et al., 1993b).

*In vitro* wurde gezeigt, daß ET die Proliferation neoplastischer Zellen verstärkt (u.a. SHICHIRI et al., 1991a,b; KITAGAWA et al., 1994; NELSON et al., 1995; KIKUCHI et al., 1996) und daß dieser Effekt durch ET-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden kann (u.a. PAGOTTO et al., 1995; NELSON et al., 1996; MORAITIS et al., 1997).

*In vivo* wurde beobachtet, daß einige maligne Tumoren ET-1 synthetisieren und daß peripher erhöhte Plasmakonzentrationen von ET-1 und seinem Vorläufer Big-ET-1 meßbar sind. Dies ist z.B. beim humanen hepatozellulären Karzinom der Fall (ISHIBASHI et al., 1993). Weiterhin unklar bleibt jedoch, ob das ET-System *in vivo* Bedeutung für das Wachstum von malignen Zellen (ŠEDO et al., 1996) oder die Angiogenese in Tumoren (ECONOMOS et al., 1992a; INAGAKI et al., 1992; ZHAO et al., 1995; ASHAM et al., 1998) hat.

Ein geeigneter experimenteller Ansatz zur Beantwortung dieser Frage ist eine Intervention mit ET-Rezeptorantagonisten, um durch gezielte Blockade des ET-Systems ET-abhängige Vorgänge zu verhindern und diese damit zu identifizieren. Dieses soll in der vorliegenden Arbeit am Modell des schnell wachsenden experimentellen Lebertumors *Morris-Hepatom-7777* an Buffalo-Ratten versucht werden.

Dazu sind folgende Schritte vorgesehen:

- Charakterisierung des Endothelinsystems im Modell des MH-7777 hinsichtlich der ET-1- und Big-ET-1-Konzentrationen in Plasma und Gewebe sowie hinsichtlich der Rezeptorausstattung des Tumorgewebes.
- Versuch der Wachstumshemmung von MH-7777-Zellen durch verschiedene ET-Rezeptorantagonisten sowie Stimulation durch ET-1 *in vitro*.
- Behandlung von hepatomtragenden Buffalo-Ratten mit einem ET-Rezeptorantagonisten und Beobachtung der Auswirkungen hinsichtlich des Tumorstwachstums, verschiedener Serumwerte und sonstiger Parameter.

Die Beantwortung der Frage, ob ET als Wachstumsfaktor *in vivo* für die Proliferation maligner Zellen oder die Tumorangio-genese von relevanter Bedeutung ist und ob Eingriffsversuche in dieses System durch ET-Rezeptorantagonisten zur Wachstumshemmung erfolgversprechend sind, könnte zur Entwicklung eines völlig neuen Ansatzes in der Krebstherapie durch Beeinflussung der Wirkung eines bis jetzt in erster Linie als kreislaufwirksam angesehenen Hormons führen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### **Zellkultur**

Accu-Jet Pipettierhilfe, Brand, Wertheim, Deutschland

Brutschrank Heto Cell House 200, Heto-Holten, Allerød, Dänemark

Elektronische Präzisionswaage BP 6100 u. BP 210S, Sartorius, Göttingen, Deutschland

ELISA-Reader MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Guernsey, England

Kühlzentrifuge Megafuge 2.0 R, Heraeus, Hanau, Deutschland

Lamin Air HB 2448, Heto-Holten, Allerød, Dänemark

Mikroskop Leica DMIL, Leica Mikroskopie & Systeme, Wetzlar, Deutschland

Mobiler Bunsenbrenner Fireboy eco, Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland

Neubauer Zählkammer N-Improved, Fein-Optik, Bad Blankenburg, Deutschland

Vortex Genie 2 Modell G 560, Scientific Industries, Bohemia, USA

##### **Untersuchungen an heptomtragenden Buffalo-Ratten**

Automatischer Gammazähler MR 480, Kontron Analytik, München, Deutschland

Brutschrank Heraeus Kelvitron t, Heraeus, Hanau, Deutschland

Dounce-Gefäße 5 ml und 30 ml, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

Embryonenquetsche, hergestellt im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin

Kühlzentrifuge J2-21, Beckman, Irvine, USA

Membran-Vakuumpumpe Vacubrand, Wertheim, Deutschland

Mikro-Dismembrator U, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

Neigungswaage Nr. 52899, Sauter, Ebingen, Deutschland

pH-Meter, Knick, Berlin, Deutschland

Photometer Eppendorf 1101 M, Eppendorf Gerätebau, Hamburg, Deutschland

Potter-Homogenisator Modell 853202, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

Präzisionsschublehre, Helios Meßtechnik, Niedernhall, Deutschland

S-Monovette Z 7,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

S-Monovette KE 2,7 ml mit EDTA, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Sonographiegerät Sigma 1 AC, Kontron, München, Deutschland mit

7,5 MHz-Schallkopf Typ S CE, Kontron, München, Deutschland

Spectrophotometer Modell 34, Beckman, Irvine, USA

Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus, Hanau, Deutschland

Ultrazentrifuge Centrikon T-2000, Kontron, Zürich, Schweiz mit

Fixed-angle Rotor Sorvall TFT 50.38, Du Pont, Delaware, USA

Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

### **Verbrauchsmaterialien**

96-Well Microtest Zellkultur-Platten Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Einmal-Filterhalter S&S Rotrand 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Eppendorf Combitips, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Standardtips, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland

Glaswaren von Schott, Mainz, Deutschland

Plastibrand Pasteurpipetten, Brand, Wertheim, Deutschland

Plastibrand Pipettenspitzen PD-Tips, Brand, Wertheim, Deutschland

Plastibrand Reaktionsgefäße, Brand, Wertheim, Deutschland

Serologische Pipetten Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Sterican Kanülen 20 G Luer Lock Gr. 1, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

Ultraschall Transmission Gel Aquasonic 100, Parker, Orange, USA

Zellkultur-Flaschen 25 ml, Sarstedt, Newton, USA

Zellkultur-Flaschen 250 ml Primaria Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Weitere Verbrauchsmaterialien der Firmen Brand (Wertheim), Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg) und Nunc (Naperville, USA).

## **2.1.2 Chemikalien**

### **Zellkultur**

BQ 123, California Peptide Research, USA

Dexamethasone, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Dimethylsulfoxid, Boehringer Ingelheim Bioprod. Partnership, Heidelberg, Deutschland

Dulbecco's Modified Eagles Medium, Bio Whittaker, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Verviers, Belgien

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories, Linz, Österreich

ET-1 (human, porcine), Sigma, Deisenhofen, Deutschland  
FCS Seromed, Kat. Nr. S 0113, Biochrom, Berlin, Deutschland  
Humaninsulin, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland  
Kolorimetrischer BrdU-Zellproliferations-ELISA, Kat. Nr. 1 647 229, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland  
L-Glutamin Seromed, Biochrom, Berlin, Deutschland  
LU 135252, Knoll, Ludwigshafen, Deutschland  
LU 302872, Knoll, Ludwigshafen, Deutschland  
MTT Thiazolyl Blue, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Penicillin/Streptomycin Seromed, Biochrom, Berlin, Deutschland  
SDS Dodecylsulfat Natriumsalz, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Trypanblau-Lösung (0,4%), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Trypsin, Seromed, Biochrom, Berlin, Deutschland

### **Untersuchungen an hepatomtragenden Buffalo-Ratten**

Bacitracin 63000 U/g, Sigma, Deisenhofen, Deutschland  
Big-ET-1-Enzymimmunoassay, Kat. Nr. BI-20072, Biomedica, Wien, Österreich  
Bovines (S-Carboxymethyl) Albumin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland  
ET-1 (human, porcine), Sigma, Deisenhofen, Deutschland  
ET-1-Enzymimmunoassay, Kat. Nr. BI-20022, Biomedica, Wien, Österreich  
[<sup>125</sup>J]ET-1 (human, porcine) Kat. Nr. QEx 259, Du Pont de Nemours, Mechelen, Belgien  
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ketamin 10% (Ketaminhydrochlorid), Mallinckrodt Veterinary, Burgwedel, Deutschland  
LU 302872, Knoll, Ludwigshafen, Deutschland  
Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid), Bayer, Leverkusen, Deutschland  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Triton X-100, Merck, Darmstadt, Deutschland

Alle sonstigen Chemikalien wurden in analytischer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Boehringer Mannheim (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 2.1.3 Zellen und Hepatome

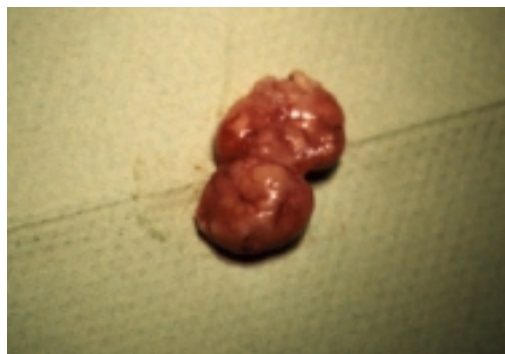
Die Zellen des MH-7777 für Zellkulturversuche wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Tauber, Charité Berlin, Standort Virchow-Klinikum, zur Verfügung gestellt.

Buffalo-Ratten mit dem MH-7777 sind im Tierstall des Instituts für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin etabliert. Dort wurden die Hepatome transplantiert und die Tierversuche durchgeführt.



**Abb. 2: Buffalo-Ratte mit ausgeprägtem *Morris*-Hepatoma-7777 am rechten Oberschenkel. Zustand 28 Tage nach Transplantation.**

Zur Transplantation wurden Ratten mit deutlich sichtbarem *Morris*-Hepatoma-7777 (siehe Abb. 2) zunächst durch i.p.-Injektion einer Mischung aus 12 mg Rompun (Xylazin) und 80 mg Ketamin pro kg Ratte narkotisiert. Die beidseitig sitzenden Hepatome sind klar begrenzt und können präzise extirpiert werden (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Präpariertes *Morris*-Hepatoma-7777.**

Nekrosefreies Tumorgewebe wurde mit einer Embryonenquetsche zerdrückt und damit weitgehend von Bindegewebe befreit. Zur Verflüssigung wurden 2 ml Gewebebrei mit 1 ml 0,154 mol/l NaCl-Lösung (0,9% isotone Kochsalzlösung) verdünnt. Jeweils 0,5 ml der resultierenden Flüssigkeit wurden über eine 20 G-Injektionskanüle beidseitig intramuskulär in die Oberschenkelmuskulatur gesunder, mit Äther betäubter Tiere injiziert. Nach drei bis vier Wochen Wachstum können die Hepatome entnommen werden.

#### **2.1.4 Versuchstiere und ihre Haltung**

Die Untersuchungen hinsichtlich der Plasma- und Gewebekonzentrationen von ET-1 und Big-ET-1, sowie die Charakterisierung der ET-Rezeptoren am MH-7777 und in Lebergewebe wurden an 250-560 g schweren, 12-15 Monate alten, männlichen und weiblichen Buffalo-Ratten aus der Zucht des Instituts für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Ebenfalls aus dieser Zucht stammten ca. 9,5 Monate alte männliche Tiere mit Gewichten zwischen 360 und 490 g für die Trinkstudie vor dem Behandlungsversuch und als Kontrollen für die Serumwerte aus dem Behandlungsversuch. Für den Behandlungsversuch wurden männliche Buffalo-Ratten von Møllegard (LI. Skensved, Dänemark) bezogen und mit einem Gewicht von 290 bis 545 g bei einem Alter von ca. 9,5 Monaten eingesetzt.

Alle Tiere erhielten Standardfutter (Altromin 1324, Altromin, Lage, Deutschland) und Leitungswasser bzw. Leitungswasser-Substanzgemisch *ad libitum*. Die Flüssigkeitszufuhr wurde im Behandlungsversuch kontrolliert.

Die Ratten wurden in Gruppen von zwei bis vier Tieren pro Käfig gehalten (Polyacrylatkäfige Typ III mit Edelstahldeckel, Ehret, Emmendingen, Deutschland; Tiereinstreu-Faser, Altromin, Lage-Lippe, Deutschland). Die Umweltbedingungen wurden mit einer Temperatur von 20°C ( $\pm$  2°C), einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem Tag-Nachtzyklus von je 12 Stunden konstant gehalten.

Der Versuch wurde beantragt und am 13.1.1997 von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin mit der Genehmigungsnummer G 0106/96 zugelassen.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Kulturbedingungen und Passage

Die Zellen des MH-7777 wurden im Brutschrank unter Kulturbedingungen von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in folgendem Medium kultiviert:

► Kulturmedium:

Dulbecco's MEM (4,5 g/l Glukose) mit folgenden Zusätzen:

10%        Fetales Kälberserum (FCS), 20 min bei 56°C inaktiviert

10<sup>5</sup> U/l    Penicillin

100 mg/l   Streptomycin

1 mg/l     Humaninsulin

0,4 mg/l   Dexamethason

Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C.

Nach dem Erhalt der Zellen des *Morris-Hepatoma-7777* wurden diese zunächst fünfmal passagiert. Die Zellen wurden jeweils bei annäherndem Erreichen der Konfluenz der Zellkolonien in eine neue Flasche umgesetzt. Konfluenz war nach Aussaat von ca. 250.000 Zellen in eine 250-ml-Zellkulturflasche mit 20 ml Kulturmedium nach etwa einer Woche erreicht.

Das Passagieren verlief wie folgt:

Nach Absaugen des Mediums aus der Flasche wurde mit 5 ml PBS gespült und 5 ml Trypsin (0,25%) zugegeben. Während der Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde die Abrundung und Ablösung der Zellen regelmäßig optisch kontrolliert. Dieser Prozeß war nach ca. 10 min abgeschlossen. Daraufhin wurde die Trypsinaktivität mit 6 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen in einem sterilen Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (1200 min<sup>-1</sup>, 5 min, 4°C). Nach dem Absaugen des Überstands konnten die Zellen resuspendiert und neu ausgesät bzw. für Versuche verwendet werden.



### 2.2.2 Inkubation mit ET-1 und ET-Rezeptorantagonisten

Zur Durchführung der Stimulations- und Hemmversuche an MH-7777-Zellen wurden folgende Lösungen hergestellt:

► ET-1-Lösung:

Lösen von  $10^{-5}$  mol/l ET-1 in FCS-freiem Kulturmedium.

Relative Molmasse von ET-1: 2492,2

► LU 135252-Lösung:

Lösen von  $10^{-3}$  mol/l LU 135252 in 0,154 mol/l NaCl-Lösung (0,9% isotone Kochsalzlösung) gemäß Herstellerangaben:

Lösen von 100 mg LU 135252 in 0,24 ml NaOH (1 mol/l) und 1 ml NaCl-Lösung. Auffüllen mit NaCl-Lösung bis kurz vor dem Erreichen der gewünschten Konzentration und Einstellen des pH-Werts mittels HCl (100 mmol/l) auf pH 7,5. Anschließend Auffüllen bis zum Endvolumen.

Relative Molmasse von LU 135252: 410,43

► LU 302872-Lösung:

Gleiches Vorgehen wie bei LU 135252 aber Lösen von 100 mg LU 302872 in 0,19 ml NaOH (1 mol/l) und Benutzung von destilliertem Wasser anstelle von NaCl-Lösung.

Relative Molmasse von LU 302872: 528,61

► BQ 123-Lösung:

Lösen von  $5 \times 10^{-3}$  mol/l BQ 123 in FCS-freiem Kulturmedium.

Relative Molmasse von BQ 123: 1832

Alle Lösungen wurden anschließend sterilfiltriert, mit FCS-freiem Kulturmedium weiterverdünnt, portioniert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Untersuchung der Wirkung von ET-1 bzw. seinen Antagonisten auf das Wachstum der MH-7777-Zellen sollten Interferenzen mit unbekannten Faktoren aus dem fetalen Kälberserum möglichst ausgeschlossen werden. Deshalb wurde ein Vorversuch durchgeführt, um die Proliferation von MH-7777-Zellen innerhalb eines Tages in FCS-reduziertem bzw. FCS-freiem Medium im Vergleich zu Standardmedium zu untersuchen. Dieser wurde analog der im folgenden geschilderten Versuche realisiert. Statt durch Lösungen mit ET-Rezeptorantagonisten wurde das FCS-haltige Medium nach einem Tag durch Medium mit 5%, 1% bzw. 0% FCS ersetzt. Die Zellmengen nach

einem weiteren Tag wurden mit *MTT*-Assays (siehe 2.2.3.1) bestimmt. Die Ergebnisse (siehe 3.3) ermöglichten die Entscheidung, die weiteren Versuche in FCS-freiem Medium durchzuführen.

Die Behandlung der Zellen mit ET-1 sowie den ET-Antagonisten *LU 135252*, *LU 302872* und *BQ 123* wurde auf 96-Well-Zellkultur-Platten durchgeführt. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer, wurde die Zellsuspension verdünnt. Pro Well kamen 100 µl mit je 6000 Zellen zur Aussaat.

Versuchsbeginn war nach einem Tag:

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und durch 100 µl FCS-freies Medium mit ansteigenden Konzentrationen der zu testenden Substanzen ersetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, deren Medium durch FCS-freies Medium ohne Zusätze ersetzt wurde. Die Konzentrationen waren logarithmisch ansteigend wie folgt:

- ET-1-Lösung  $10^{-11} - 10^{-5}$  mol/l
- LU 135252-Lösung  $10^{-12} - 10^{-4}$  mol/l
- LU 302872-Lösung  $10^{-12} - 10^{-4}$  mol/l
- BQ 123-Lösung  $10^{-12} - 10^{-3}$  und  $5 \times 10^{-3}$  mol/l

Nach 24stündiger Inkubation bei gleichen Kulturbedingungen wurden Proliferationsassays bzw. die Trypanblau-Färbung (siehe 2.2.5) durchgeführt.

## 2.2.3 Proliferationsassays

### 2.2.3.1 *MTT*-Assay

Der kolorimetrische *MTT*-Assay ist ein seit 1983 (MOSMANN, 1983) weit verbreitetes Verfahren zur Messung der Zahl lebender Zellen in Zellkultursystemen. Er beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes *MTT* (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid,  $C_{18}H_{16}N_5SBr$ ) durch verschiedene intrazelluläre Enzyme. Dies geschieht unter Bildung eines wasserunlöslichen Formazan-Farbstoffs, der in einem weiteren Schritt solubilisiert wird. Photometrisch kann die Farbstoffbildung quantifiziert werden. Sie korreliert nach Abzug des Leerwerts direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur.

► MTT-Lösung:

Lösen von 5 g/l MTT in PBS. Anschließend Sterilfiltration und Aufbewahrung unter Lichtabschluß im Kühlschrank bei 4°C.

► SDS-Lösung:

Lösen von 100 g/l SDS ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ) in 0,01 mol/l HCl.

Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

Zur Durchführung wurden in jeden *Well* 20 µl *MTT*-Lösung pipettiert. Innerhalb der nächsten vier Stunden bildeten sich intrazellulär mikroskopisch gut erkennbare Farbstoffkristalle. Anschließend wurde zur Lyse der Zellen und zur Solubilisierung der Formazansalze 100 µl *SDS*-Lösung pro *Well* zugegeben. 24 Stunden später erfolgte die Messung der Absorption mittels eines *Multiwell*-Spektrophotometers (*ELISA-Reader*) bei einer Wellenlänge von 570 nm.

### 2.2.3.2 *BrdU*-Assay

Der *BrdU*-Assay mißt im Gegensatz zum *MTT*-Assay nicht die Stoffwechselaktivität der vorhandenen Zellen, sondern deren DNA-Synthese als direkteren Ausdruck der proliferativen Aktivität. Die Methode wurde als Alternative zum „Goldstandard“ der Proliferationsassays, dem [ $^3H$ ]*Thymidin*-Assay entwickelt (PORSTMANN et al., 1985). Wie dieser beruht auch der *BrdU*-Assay auf dem Einbau eines markierten Nukleotids, das über nachgeschaltete Reaktionen quantifizierbar gemacht wird. Entstehende Farbstoffe und damit die Absorption, sind nach Abzug des Leerwerts proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen in der jeweiligen Mikrokultur.

Es wurde nach der Anleitung des entsprechenden Kits von Boehringer Mannheim (*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*, Kat. Nr. 1 647 229) vorgegangen:

Nach der festgesetzten Inkubationszeit von in diesem Fall 24 Stunden, wurden pro *Well* 10 µl einer Lösung mit brommarkiertem *Desoxyuridin* (*5-Bromo-2'-desoxyuridin*) zugegeben, was zu einer *BrdU*-Endkonzentration von 10 µmol/l führte. In der folgenden Reinkubationszeit von 120 min vollzog sich der Einbau des Pyrimidinanalogons *BrdU* in die DNA proliferierender Zellen anstelle von *Thymidin*. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt. Nach der Denaturierung der Zellen durch ein mitgeliefertes Schnellfixans erfolgte die Zugabe von hochspezifischen *BrdU*-Antikörpern in 100 µl Lösung. Nach weiteren 90 min wurden drei Waschgänge durchgeführt und durch Zugabe einer mitgelieferten Substratlösung eine Reaktion zur Detektion der Immunkomplexe ausgelöst. Diese Reaktion wurde nach 30 min mit 25 µl  $H_2SO_4$  (1 mol/l) gestoppt und unmittelbar anschließend die Absorption in einem *Multiwell*-Spektrophotometer bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

### 2.2.4 LDH-Bestimmung

Um durch die zugegebenen Substanzen möglicherweise ausgelöste toxische Effekte auszuschliessen, wurde eine Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellkulturen durchgeführt.

Als Negativkontrolle dienten die unbehandelten Kulturen, während zur Erzeugung einer Positivkontrolle MH-7777-Zellen unter gleichen Bedingungen mit dem zelltoxischen *Dimethylsulfoxid* (20%, *DMSO*) behandelt wurden. Um über einen anderen Mechanismus Zellschädigung herbeizuführen, wurde in einigen Kulturen das Medium durch nährstofffreie PBS ersetzt. Eine noch deutlichere Form der Positivkontrolle wurde hergestellt, indem die Zellen mechanisch vom Boden gelöst und durch eine dünne Kanüle gezogen wurden. Ein Leerwert ohne Zellen lief mit.

Um eine größere Menge Überstand zu gewinnen, wurden die Ansätze in 25-ml-Zellkulturflaschen durchgeführt. Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß die LDH-Konzentrationen im Überstand der 96-Well-Zellkultur-Platten unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode lagen, wurde die Zellzahl pro ml Kulturmedium erhöht. Zunächst wurden 500.000 Zellen pro Flasche in 4 ml FCS-haltigem Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml FCS-freies Medium mit den untersuchten Substanzen ersetzt. Es wurden jeweils die höchsten im Proliferationsexperiment (*siehe* 2.2.2) eingesetzten Konzentrationen gewählt, um die Ausprägung möglicher toxischer Effekte zu maximieren. Diese lagen für *LU 135252* und *LU 302872* bei  $10^{-4}$  mol/l, sowie für *BQ 123* bei  $10^{-3}$  mol/l. Das Medium der Negativkontrollen wurde gegen 2 ml FCS-freies Medium ohne Zusätze ausgetauscht. Dem FCS-freien Medium der Positivkontrollen war einerseits 20% *DMSO* zugesetzt, während andererseits das Medium nach 24 Stunden durch 2 ml PBS ersetzt wurde. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation - analog den Proliferationsexperimenten unter 2.2.2 - wurden die Überstände entnommen. Im Labor des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin, Standort Mitte, bestimmte Dr. med. Lun mittels eines üblichen Analyseautomaten die LDH-Aktivitäten (Gesamt-LDH). Ein Teil der Überstände wurde zusätzlich zur irET-1-Bestimmung im ET-1-Assay eingesetzt (*siehe* 2.2.6).

### 2.2.5 Trypanblau-Färbung

Eine weitere Methode zur Überprüfung des Zustands von Zellen ist die Anfärbung mit Trypanblau. Lebende Zellen haben die Fähigkeit diesen Farbstoff abzuwehren und nicht in ihr Zytoplasma eindringen zu lassen. Wenn Zellen nach der Farbstoffzugabe mikroskopisch bläulich angefärbt erscheinen, spricht dies für eine Schädigung bzw. Zelluntergang durch toxische oder auch apoptotische Prozesse.

Nach Durchführung der Ansätze, wie oben beschrieben (*siehe* 2.2.2), wurde das Kulturmedium abgesaugt und jedem *Well* 20 µl Trypanblau-Lösung (0,4%) zugegeben. Diese wurde nach 3 min wieder abgesaugt. Als Positivkontrollen dienten Zellen, die 24 Stunden mit 20% *DMSO* im Medium inkubiert waren, sowie Zellen deren Medium durch PBS ersetzt worden war. Diese Positivkontrollen wurden auf gleiche Weise angefärbt. Es folgte die mikroskopische Auswertung der Anfärbbarkeit der MH-7777-Zellen nach 24ständiger Inkubation mit ET-1, den verschiedenen ET-Rezeptorantagonisten in ansteigenden Konzentrationen sowie *DMSO* und PBS im Vergleich zu unbeeinflussten Kontrollen.

Dazu wurde eine semiquantitative optische Quantifizierungsskala von 0 bis 5 benutzt. Niedrige Werte entsprechen einer geringen Anzahl erkennbar bläulich angefarbter Zellen, während bei einem Wert von 5 alle Zellen angefärbt und damit geschädigt erscheinen.

In jedem Ansatz wurde der Anteil bläulich angefarbter Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl mikroskopisch eingeschätzt. Dementsprechend wurden Werte von 0 bis 5 auf der optischen Quantifizierungsskala zugeordnet.

### 2.2.6 ET-1-Bestimmung

Zur Abklärung möglicher endogener ET-1-Produktion der MH-7777-Zellen wurde ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von irET-1 im Kulturüberstand der Hepatomzellen durchgeführt. Es kam der auch zur LDH-Bestimmung (*siehe* 2.2.4) gewonnene Überstand zur Verwendung. Allerdings wurde irET-1 lediglich im Medium der unbehandelten Kontrollen, sowie im Medium der *LU 135252*-behandelten Zellen bestimmt. Als Negativkontrolle diente zellfreies Medium. Der ET-1-Assay ist unter 2.3.2.4 beschrieben.

## 2.3 Untersuchungen an hepatomtragenden Buffalo-Ratten

### 2.3.1 Präparation von Hepatomen und Leber

Für die Untersuchungen am MH-7777 (Bestimmung von Plasma- und Gewebe-ET-1 und -Big-ET-1 sowie *Scatchard*-Rezeptor-Bindungsstudie) wurden MH-7777 21 Tage nach erfolgter Transplantation (*siehe auch 2.1.3*) aus der Oberschenkelmuskulatur 12-15 Monate alter, 250-560 g schwerer, narkotisierter (12 mg Xylazin und 80 mg Ketamin pro kg Ratte i.p.) Buffalo-Ratten freipräpariert. Nach Entfernung von zentralen nekrotischen Anteilen wurde das Gewebe umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Anschließend wurde bei den gleichen Tieren sowie bei weiteren gesunden Kontrolltieren (*siehe Tabelle 6*) die Leber entnommen und auf identische Weise eingefroren.

**Tabelle 6: Alter, Gewicht und Geschlechtsverhältnisse der untersuchten Buffalo-Ratten.** Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE). Je Gruppe n=11.

Gruppe	Alter (Monate)	Gewicht (g)	Geschlecht ♂:♀
<b>MH-7777</b>	13,8 $\pm$ 0,45	349,9 $\pm$ 40,2	5:6
<b>Kontrolle</b>	13,1 $\pm$ 0,30	343,6 $\pm$ 31,1	4:7

### 2.3.2 Bestimmung von Plasma- und Gewebe-ET-1 und -Big-ET-1

#### 2.3.2.1 Plasmagewinnung

Vor der Tumorentnahme wurde von den in 2.3.1 genannten narkotisierten Tieren durch Einstechen einer Glaskapillare in den retroorbitalen Venenplexus Blut in ein EDTA-Röhrchen abgenommen. Dieses wurde 15 min zentrifugiert (3000 min<sup>-1</sup>, 4°C, Kühlzentrifuge J2-21) und das im Überstand resultierende Plasma bis zur weiteren Verwendung im (Big-)ET-1-Assay bei -20°C gelagert.

#### 2.3.2.2 Extraktion von Gewebe-ET-1 und -Big-ET-1

- ▶ Phosphatpuffer:  
140 mmol/l NaCl  
2,6 mmol/l KCl

8 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1,4 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1% Triton-X

Einstellen des pH auf 7,4. Lagerung bei 4°C.

Hepatom- bzw. Lebergewebe wurde aufgetaut und Stücke von annähernd 350 mg abgewogen. Diese wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff vorgefroren, um sie dann im ebenfalls vorgefrorenen mittelgroßen Schüttelgefäß eines Mikrodismembrators zu pulverisieren (60 s bei  $2000 \text{ min}^{-1}$ ). Das Gewebepulver wurde in 2 ml Phosphatpuffer aufgenommen und mittels eines Vortex-Geräts homogenisiert. Es folgte eine Ultrazentrifugation (60 min bei  $100.000 \times g$ , 4°C, Centrikon T-2000).

Durch das Detergens *Triton-X* wurden die Plasmamembranen der noch intakten Zellen aufgelöst. Der Überstand als Gewebeextrakt entspricht weitgehend dem Zytosol, in dem (Big-)ET-1 vorwiegend zu erwarten ist.

Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung zur Proteinbestimmung und im (Big-)ET-1-Assay bei -20°C tiefgefroren.

### 2.3.2.3 Proteinbestimmung

Eine Proteinbestimmung in den Gewebeextrakten bzw. in den rohen Plasmamembranfraktionen (*siehe* 2.3.3.1) ist notwendig, da in der Auswertung die (Big-)ET-1-Konzentrationen bzw. die ET-Rezeptordichten auf die jeweiligen Proteinkonzentrationen bezogen werden.

Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951). Diese beruht auf zwei Reaktionen:

- Bildung eines farbigen (blau-violetten) Komplexes zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung.
- Reduktion von Heteropolysäuren (Phosphormolybdän-, Phosphorwolframsäure) durch aromatische Aminosäuren unter Bildung eines blauen Farbstoffs.

Zunächst wurde die Extinktion von Proteinlösungen bekannter Konzentrationen nach Reaktion mit Kupfer(II)-Ionen und *Folin-Phenol*-Reagenz gemessen, um eine Standardkurve zu erstellen. Die gleichen Reaktionen wurden mit den zu bestimmenden Lösungen durchgeführt. Anhand der gemessenen Extinktionen konnte durch Interpolation der Standardkurve die gesuchte Proteinkonzentration ermittelt werden.

- ▶ Lösung A:  
0,1 mol/l NaOH  
2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- ▶ Lösung B:  
34 mmol/l Tri-Natriumcitrat  
20 mmol/l Kupfer(II)sulfat-pentahydrat (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O)
- ▶ Folin-Phenol-Reagenz  
Verdünnung von 100 ml Folin-Ciocalteus Phenolreagenz mit  
110 ml destilliertem Wasser.
- ▶ Proteinlösung: 1 g/l Bovines Serumalbumin (BSA)

Aufbewahrung der Lösungen bei 4°C, *Folin-Phenol-Reagenz* bei Raumtemperatur. Durchführung des Versuchs ebenfalls bei Raumtemperatur, wenn nicht anders angegeben.

Gemäß folgendem Pipettierschema wurden verschiedene bekannte Proteinkonzentrationen erzielt sowie die zu messenden Gewebeextrakte angesetzt (*siehe Tabelle 7*):

**Tabelle 7: Pipettierschema für die Proteinbestimmung nach Lowry.**

Probe	µl Proteinlösung	µl destilliertes Wasser
Leerwert	-	1000
Standardlösung 1	50	950
Standardlösung 2	100	900
Standardlösung 3	200	800
Standardlösung 4	300	700
Standardlösung 5	500	500
Zu bestimmende Lösungen	20	980

Durch Mischung von 100 ml Lösung A und 2 ml Lösung B erhält man Lösung C, die wegen begrenzter Haltbarkeit erst kurz vor Versuchsbeginn hergestellt werden darf.

Zu jeder Probe wurde 4 ml Lösung C pipettiert und gut geschüttelt. Nach 5 min folgten 0,5 ml *Folin-Phenol-Reagenz* und erneute gute Durchmischung. Während der anschließenden 30minütigen Inkubation im Brutschrank (50°C) bildeten sich die farbigen Verbindungen. Die Extinktion konnte nun bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen werden.



Alle Proben wurden doppelt angesetzt, gemessen und der Mittelwert gebildet. Der Mittelwert des Leerwerts wurde von allen Extinktionswerten subtrahiert.

Aus den Werten der Standardlösungen wurde eine Standardkurve von Extinktion gegen Proteinkonzentration erstellt. Im Konzentrationsbereich bis 500 mg/l ist die Funktion annähernd linear, so daß eine Regressionsgerade durch die Meßwerte gelegt werden kann. Auf dieser konnten für die Extinktionswerte der zu bestimmenden Lösungen die entsprechenden Proteinkonzentrationen abgelesen werden.

#### **2.3.2.4 ET-1- und Big-ET-1-Assay**

Es wurde ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von irET-1 verwendet (Biomedica, Wien, Kat. Nr. BI-20022): Mikrotiterplatten sind mit einem immunaffinitätschromatographisch gereinigten polyklonalen ET-1-Antikörper beschichtet. Das irET-1 im zugegebenen Plasma bindet sich daran und ein monoklonaler Zweitantikörper bildet ein *Sandwich*. Über einen peroxidasemarkierten Detektionsantikörper wird die Menge an gebundenem Zweitantikörper photometrisch bestimmt. Die Farbentwicklung ist direkt proportional der ET-1-Konzentration.

Es wurde nach der Anleitung des erwähnten Kits vorgegangen:  
Je 200 µl mitgelieferter ET-1-Standard (0,4; 1; 2,5; 6,25; 15,6 pmol/l), mitgelieferte ET-1-Positivkontrolle, bzw. zu bestimmendes Plasma (*aus 2.3.2.1*) oder Gewebeextrakt (*aus 2.3.2.2*) wurden in verschiedene *Wells* pipettiert. Je 50 µl Zweitantikörper wurden in alle *Wells*, außer dem Leerwert hinzupipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden mit Folie abgedeckt und 3 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Entleerung der *Wells* und drei Waschdurchgänge mit jeweils 350 µl mitgeliefertem Waschpuffer. Der Zugabe von peroxidasegekoppeltem anti-Maus IgG Antikörper folgte eine erneute Inkubation für 60 min bei 37°C im Schüttler. Nach weiteren drei Waschgängen wurde 200 µl *Tetramethylbenzidin*-Lösung als Substrat in alle *Wells* pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Nach der Zugabe von 50 µl mitgelieferter Stopplösung in alle *Wells* wurde die Platte gut geschüttelt und sofort die Extinktion bei 450 gegen 690 nm als Referenz gemessen.

Der Absorptionswert des Leerwerts wurde von allen anderen Meßwerten abgezogen. Sodann wurde aus den Meßwerten der Standards eine Standardkurve erstellt, auf der die ET-1-Konzentrationen der Proben abgelesen werden konnten.

Der Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von irBig-ET-1 (Biomedica, Wien, Kat. Nr. BI BI-20072) unterschied sich nur in wenigen Punkten:

Einsatz von nur 100 µl mitgeliefertem Big-ET-1-Standard, mitgelieferter Big-ET-1-Positivkontrolle, zu bestimmendem Plasma oder Gewebeextrakt, peroxidasegekoppeltem Antikörper sowie *Tetramethylbenzidin*-Lösung.

### 2.3.3 *Scatchard*-Rezeptor-Bindungsstudie

Die *Scatchard*-Rezeptor-Bindungsstudie ist ein Verfahren zur Bestimmung von Rezeptoraffinität und Rezeptordichte an Zellen oder in Gewebe. In der vorliegenden Arbeit sollten Affinität und Dichte von ET-Rezeptoren an MH-7777- sowie Lebergewebe gemessen werden.

Dazu ist zunächst die Aufarbeitung des Gewebes notwendig, um eine standardisierte Gewebefraktion zu erhalten, auf der der interessierende Hauptanteil der ET-Rezeptoren vermutet wird. Es wird eine Proteinbestimmung durchgeführt (*siehe* 2.3.2.3), um in der anschließenden Bindungsstudie Gewebeproben mit gleicher Proteinkonzentration einsetzen zu können. In der Auswertung wird die Rezeptordichte auf die Proteinmenge bezogen. In der folgenden Bindungsstudie wird das Verhältnis der Bindung von radioaktiv markiertem zu unmarkiertem ET-1 in Gegenwart eines ET<sub>A</sub>- bzw. ET<sub>B</sub>-Rezeptorliganden untersucht.

Die Präparation der rohen Plasmamembranfraktionen aus den MH-7777 und die Bindungsstudie wurden mit geringen Modifikationen nach der von HOCHER et al. (1992, 1995a,b) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Auswertung wird durch die lineare Umformung nach SCATCHARD (1949) ermöglicht.

#### 2.3.3.1 Präparation der rohen Plasmamembranfraktion

Die Methode geht auf NAMBI et al. (1990) zurück.

- ▶ Scatchard-Bindungspuffer ohne bovines Serumalbumin (BSA):  
100 mmol/l      Tris-HCl ( $C_4H_{12}ClNO_3$ )  
5 mmol/l         $MgCl_2$   
Einstellen des pH auf 7,4 mittels HCl (1 mol/l) und Lagerung bei -20°C.
- ▶ Scatchard-Bindungspuffer mit BSA:  
Wie Scatchard-Bindungspuffer ohne BSA, zusätzlich:  
0,1% = 1 g/l      BSA

Es wurde 0,4 g Hepatom- bzw. Lebergewebe abgewogen und mit einer Schere grob zerkleinert. Der Brei wurde in 10 ml  $NaHCO_3$  (20 mmol/l) aufgenommen und über

20 Durchgänge in einem elektrischen Potter-Homogenisator bei  $1000 \text{ min}^{-1}$  weiter zerkleinert. Es schlossen sich 20 Hübe mit lose sitzendem L-Pistill im Dounce-Gefäß an.

Die Homogenate wurden 15 min bei  $3000 \text{ min}^{-1}$  ( $1000\times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , Bremse offen, Kühlzentrifuge J2-21) zentrifugiert, um größere Zellfragmente zu eliminieren. Der verbleibende Überstand wurde erneut 30 min bei  $18.250 \text{ min}^{-1}$  ( $40.000\times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , Bremse offen, Centrikon T-2000) ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml *Scatchard*-Bindungspuffer ohne BSA resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung (Proteinbestimmung siehe 2.3.2.3, Bindungsstudie) bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Alle geschilderten Arbeitsschritte wurden auf Eis bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt.

### 2.3.3.2 Bindungsstudie

Ziel der Bindungsstudie ist es, eine Sättigungskurve für ET-1, d.h. eine Funktion von gebundenem zu ungebundenem ET-1 bei steigenden ET-1-Konzentrationen zu erstellen. Dazu wird ET-1 gemäß der untenstehenden ET-1-Verdünnungsreihe zur Lösung der rohen Plasmamembranfraktion zugegeben. Um die Bindung nach der Inkubation messen zu können, wird zusätzlich radioaktiv markiertes ET-1 eingesetzt. Einerseits bindet ET-1 selektiv an sättigbaren spezifischen Bindungsstellen - den ET-Rezeptoren - andererseits auch unspezifisch an Strukturen wie Proteinen, Lipiden, Zellmembranen und am Kunststoffmaterial. Diese unspezifische Bindung ist nicht sättigbar, sondern steigt proportional zur Konzentration des Liganden an. Unspezifische Bindungsstellen sind in wesentlich höherer Anzahl vorhanden als spezifische. Demgegenüber ist die Affinität des Liganden zu den unspezifischen Bindungsstellen deutlich geringer als zu den spezifischen. Um den Anteil der unspezifischen Bindung zu quantifizieren, wird unmarkiertes ET-1 in 50.000fachem Überschuß zugegeben. Das markierte ET-1 wird aufgrund dieses Überschusses praktisch vollständig von der geringen Anzahl spezifischer Bindungsstellen verdrängt. Die noch zu messende Bindung des radioaktiven ET-1 entspricht der unspezifischen Bindung. Die spezifische Rezeptorbindung erhält man durch Subtraktion der unspezifischen von der Gesamtbindung.

► Lösung der rohen Plasmamembranfraktion:

Verdünnen der Lösung aus 2.3.3.1 gemäß Ergebnissen aus 2.3.2.3 auf eine Proteinkonzentration von  $80 \mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$  Ansatz mit *Scatchard*-Bindungspuffer ohne BSA. Verarbeitung auf Eis.

► ET-1-Verdünnungsreihe:

Lösen von ET-1 in *Scatchard*-Bindungspuffer mit BSA.

Herstellung folgender Konzentrationen:

0 mol/l, 0,55 nmol/l, 1,66 nmol/l, 5 nmol/l, 15 nmol/l, 22,5 nmol/l, 45 nmol/l, 10  $\mu$ mol/l (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung).

Lagerung bei -20°C.

► ET-Rezeptorantagonistenlösung:

Lösen von 1 g/l BQ 123 bzw. BQ 3020 in Scatchard-Bindungspuffer mit BSA.

Lagerung bei -20°C.

In 10 ml *Scatchard*-Bindungspuffer mit BSA wurde 1 g/l *Bacitracin* gelöst. Es wurden ca. 60  $\mu$ l [ $^{125}$ J]ET-1-Lösung mit einer Aktivität von ca. 1,85 MBq/l (spezifische Aktivität des [ $^{125}$ J]ET-1: 81.400 TBq/mol) zugegeben, bis die Zählraten des Gammazählers in 50  $\mu$ l bei 30.000-40.000 cpm lagen. Zur selektiven Analyse der ET-Rezeptorsubtypen wurden jeweils 4,5 ml dieser Lösung mit 82,5  $\mu$ l entweder *BQ 123*-Lösung oder *BQ 3020*-Lösung ergänzt. Die resultierende Konzentration ist damit ausreichend zur völligen Absättigung des betreffenden Rezeptorsubtyps.

Pro Lösung roher Plasmamembranfraktion wurden in zwei Sätze à acht Eppendorfreaktionsgefäße jeweils 50  $\mu$ l der acht verschiedenen Konzentrationen der ET-1-Verdünnungsreihe pipettiert. Dazu kamen in einen Satz je 50  $\mu$ l der radioaktiven Antagonistenlösung mit *BQ 123*, in den anderen Satz je 50  $\mu$ l der Lösung mit *BQ 3020*.

Zum Starten der Bindungsreaktion wurden 50  $\mu$ l der Lösung roher Plasmamembranfraktion eines Organs bzw. Tumors in jedes der 2×8 Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur.

Als geeignete Inkubationszeit zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Assoziations- und Dissoziationsvorgängen hatten sich 120 min erwiesen. Nach dieser Zeit wurde die Bindungsreaktion durch 1 ml kalten (4°C) Bindungspuffer mit BSA gestoppt.

Freies und rezeptorgebundenen (sowohl unmarkiertes als auch radioaktives) ET-1 wurde durch Zentrifugation bei 13.000 min<sup>-1</sup> (20.000×g, 10 min, 4°C, Biofuge 13) getrennt. Die Pellets wurden zwei weitere Male mit eiskaltem *Scatchard*-Bindungspuffer mit BSA gewaschen. Dazu wurde der Überstand abgesaugt, 1 ml *Scatchard*-Bindungspuffer mit BSA zugegeben, standardisiert 10 s mit einem Vortex-Gerät auf höchster Schnelligkeitsstufe gemischt und erneut unter o.g. Bedingungen zentrifugiert.

Nach dem letzten Absaugvorgang erfolgte die Zählung der radioaktiven Impulse pro Minute im Pellet durch einen automatischen Gammazähler. Damit konnte die Menge des gebundenen [ $^{125}$ J]ET-1 quantifiziert werden.

Alle Ansätze wurden parallel dreifach durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

Der Wert für die unspezifische Bindung im Ansatz mit 10 µmol/l ET-1 wurde von den Werten aller anderer Ansätze abgezogen, um die spezifische Bindung zu erhalten.

Aus der bekannten Aktivität des [ $^{125}$ J]ET-1 und einer bekannten Zählausbeute des Gammazählers von 78%, konnte die Menge des [ $^{125}$ J]ET-1 im Testansatz errechnet werden. Zusammen mit der bekannten Menge des unmarkierten ET-1 aus der ET-1-Verdünnungsreihe ergab sich die Gesamt-ET-1-Menge im Testansatz. Durch Übertragung des bekannten Verhältnisses von spezifisch gebundenem zu gesamtem [ $^{125}$ J]ET-1 auf das gesamte ET-1 (unmarkiert und markiert), erhält man die Menge des spezifisch gebundenen und freien Gesamt-ET-1. Daraus konnte die gesuchte Sättigungskurve erstellt werden.

### 2.3.4 Behandlungsversuch mit *LU 302872*

In einem Vorversuch wurde die normale Trinkmenge einer gesunden Buffalo-Ratte ermittelt. Außerdem sollte die Verträglichkeit von *LU 302872* im Trinkwasser geprüft werden.

Dazu wurden 11 männliche Buffalo-Ratten im Alter von ca. 9,5 Monaten und einem Gewicht von 360-490 g (Mittelwert  $\pm$  SE: 436,4  $\pm$  11,2 g) über 28 Tage kontrolliert. Vier Tiere bekamen wie bisher Leitungswasser *ad libitum*. Bei sieben Tieren wurde das Trinkwasser durch eine *LU 302872*-Lösung ersetzt (Zusammensetzung *siehe unten*). Die Trinkmenge und das Körpergewicht wurden regelmäßig im Abstand von wenigen Tagen gemessen.

**Tabelle 8: Alter, Gewicht und Geschlecht der im Behandlungsversuch eingeschlossenen Buffalo-Ratten.** Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE). Je Gruppe n=22.

Gruppe	Alter (Monate)	Gewicht (g)	Geschlecht
<b>Behandlung</b>	9,41 $\pm$ 0,04	467,3 $\pm$ 13,5	♂
<b>Kontrolle</b>	9,44 $\pm$ 0,03	486,1 $\pm$ 9,1	♂

Der Behandlungsversuch wurde an 44 männlichen Buffalo-Ratten mit einem Alter von ca. 9,5 Monaten und einem Gewicht von 290-545 g durchgeführt (*siehe Tabelle 8*). Die Tiere bekamen beidseitig *Morris*-Hepatome in die Oberschenkelmuskulatur transplantiert, wie oben beschrieben (*siehe 2.1.3*). Die Tiere wurden zur Transplantation

nacheinander aus den Käfigen genommen, danach alternierend zwei Gruppen zugeordnet und damit randomisiert verteilt.

Die Gruppen unterschieden sich weder im Vorversuch, noch im Behandlungsversuch hinsichtlich des Alters oder Gewichts statistisch signifikant voneinander.

Die Behandlungsgruppe erhielt als Trinkflüssigkeit statt Leitungswasser eine Lösung mit *LU 302872*:

► Lösen von *LU 302872* in Leitungswasser gemäß Herstellerangaben:

1,66 g *LU 302872*

31,4 ml NaOH (0,1 mol/l)

ca. 20 ml Leitungswasser

Nach vollständiger Lösung Auffüllen mit Leitungswasser auf 0,9 l.

Einstellen des pH-Werts mit *HCl* (100 mmol/l) auf 7,5 .

Auffüllen mit Leitungswasser auf 1 l.

Diese Lösung entspricht 3,15 mmol/l *LU 302872*. Sie wurde so berechnet, daß sich für eine 500 g schwere Ratte bei einer täglichen Trinkmenge von 30 ml eine angestrebte *LU 302872*-Dosis von 100 mg/kg×d ergibt. Im Verlauf des Versuchs zeigte sich eine deutliche Abnahme der Trinkmenge, so daß die Zusammensetzung der Lösung verändert wurde: Ab dem 20. Versuchstag wurde die doppelte Menge *LU 302872* (3,33 g/l Lösung) eingesetzt und zusätzlich 10% Saccharose (100 g/l Lösung) zugegeben.

Die Kontrollgruppe erhielt wie bisher Leitungswasser *ad libitum*.

Alle fünf Tage wurde die *LU 302872*-Lösung neu angesetzt und zusammen mit dem Leitungswasser ausgetauscht. Gleichzeitig wurde die Trinkmenge der zurückliegenden fünf Tage durch Wiegen der Trinkflaschen bestimmt. Die durchschnittliche Trinkmenge pro Tier und Tag ergab sich aus der Division der pro Käfig getrunkenen Flüssigkeit durch die Anzahl der Ratten pro Käfig und die Zahl der vergangenen Tage. Ebenfalls alle fünf Tage wurden die Ratten anschließend an die Bestimmung der Trinkmenge gewogen.

Der Versuch erstreckte sich über 28 Tage. Überwacht wurden die Trinkmenge, das Körpergewicht, das Verhalten und Aussehen der Tiere sowie das Tumorwachstum. Am 28. Tag wurde Serum gewonnen (*siehe 2.3.4.4*) und die Tumoren wurden präpariert (*siehe 2.3.4.3*). Auch Leber, Herz und Nieren wurden entnommen und gewogen.

Zur Beurteilung des Tumorwachstums wurden verschiedene Methoden verwendet.

#### 2.3.4.1 Tumorwachstumsmessung mit Schublehre

Zur regelmäßigen Überwachung des Wachstumsverlaufs der Hepatome wurden die Durchmesser aller Tumoren in Abständen von fünf Tagen mit einer Schublehre in leichter Äthernarkose bestimmt. Diese Methode wurde für das MH in der Literatur u.a. von ERDSTEIN et al. (1984; 1989) und MISHKIN et al. (1981) beschrieben. Die Messungen wurden immer vom gleichen Untersucher durchgeführt, ohne daß dieser zum Zeitpunkt der Messung die Gruppenzugehörigkeit der Tiere kannte.

Der Tumor wurde durch das dünne umgebende Gewebe hindurch palpiert und der größte in bezug zum Oberschenkel transversale Durchmesser mit der Schublehre bestimmt (*siehe Abb. 4*).



**Abb. 4: Messung des transversalen Durchmessers eines MH-7777 *in vivo* mittels Schublehre. 28. Tag nach Transplantation.**

#### 2.3.4.2 Sonographische Tumervolumenbestimmung

Einmalig wurde am 20. Tag nach Transplantation das Tumervolumen sonographisch bestimmt.

An den narkotisierten (12 mg Xylazin und 80 mg Ketamin pro kg Ratte i.p.) Buffalo-Ratten wurde sonographisch ein in bezug zum Oberschenkel transversaler Schnitt durch den Tumor gelegt. Längs- und Querdurchmesser wurden vermessen und ein Ausdruck angefertigt. Unter der Annahme eines Rotationsellipsoids wurde über die Formel  $\frac{4}{3}\pi \cdot a \cdot b^2$  das angenäherte Tumervolumen berechnet. Dabei entsprechen a und

b den Radien, also der Hälfte der gemessenen Durchmesser. Der größere Längsdurchmesser ist  $2 \cdot a$ , der kleinere Querdurchmesser entspricht  $2 \cdot b$ .

Das Sonographiegerät (Sigma 1 AC, Kontron, München, Deutschland) wurde uns für diesen Zweck freundlicherweise von Dr. G. Baatz überlassen. Die beste Auflösung ergab ein 7,5 MHz-Schallkopf (Typ S CE, Kontron, München, Deutschland), der uns freundlicherweise von Herrn Hölscher (Kontron, Filiale Berlin, Deutschland) leihweise zur Verfügung gestellt wurde.

#### **2.3.4.3 Messung von Tumorgewicht und -volumen nach Entnahme**

Am 28. Tag nach Transplantation wurden die Tumoren in Narkose entnommen, wie *unter 2.3.1* beschrieben.

Die Hepatome wurden trockengetupft und einzeln gewogen. Außerdem erfolgte eine Vermessung von Höhe, Breite und Tiefe der freipräparierten Tumoren mit der Schublehre (*siehe Abb. 5*). Als Annäherung an das Tumolvolumen wurde aus diesen Werten über die Formel  $\frac{4}{3}\pi \cdot abc$  (LINDER-HOROWITZ et al. 1969) ein Volumen errechnet. Dabei sind a, b und c die jeweiligen Radien, entsprechen also jeweils der Hälfte von Höhe, Breite und Tiefe.



**Abb. 5: Vermessung eines freipräparierten MH-7777 mit der Schublehre.**

#### **2.3.4.4 Serumanalysen**

Vor der Tumorentnahme wurde den narkotisierten Tieren durch Einstechen einer Glaskapillare in den retroorbitalen Venenplexus Blut in ein Serum-Röhrchen entnommen. Dieses wurde 15 min zentrifugiert ( $3000 \text{ min}^{-1}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , Kühlzentrifuge J2-21) und das im Überstand resultierende Serum bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.



Von gesunden, altersgleichen (ca. 9,5 Monate) männlichen Buffalo-Ratten aus der Zucht des Instituts für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin wurde auf die gleiche Weise Serum gewonnen. Dieses diente als Kontrollmaterial von gesunden Tieren ohne Hepatom.

Im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin, Standort Mitte, wurden von Dipl. chem. Priem in den Serumproben Natrium, Gesamtprotein, Albumin, Kreatinin, Harnstoff (Urea), Cholesterin, Triglyceride, Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase, Glukose und LDH mit Routineverfahren bestimmt.

## 2.4 Statistische Verfahren

Die gemessenen und errechneten Werte und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SE) oder wenn angegeben  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt.

Die Unterschiede zwischen Gruppen wurden mit Hilfe von verbundenen und unverbundenen t-Tests festgestellt.

Zur Sicherung des Unterschieds der mit der Schublehre ermittelten Wachstumskurven und Tiergewichtsverläufe wurden mit Hilfe von Dr. Trautner (Institut für Arbeitsmedizin, Sozialmedizin und Epidemiologie der Humboldt Universität zu Berlin) „*Analysis of variance*“-Berechnungen (ANOVA) mit dem SAS-System durchgeführt.

Ein Ergebnis wurde als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als 5% war.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Plasma- und Gewebekonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 bei hepatomtragenden Buffalo-Ratten

##### 3.1.1 Plasmakonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1

Die Plasmawerte für irET-1 und irBig-ET-1 zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen hepatomtragenden und gesunden Buffalo-Ratten. Dies gilt sowohl für einen Vergleich der Gesamtgruppe wie auch für eine nach Geschlechtern getrennte Auswertung (*siehe Tabelle 9*). Auch die Werte beider Geschlechter innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich nicht statistisch signifikant.

Der Quotient irET-1/irBig-ET-1 unterscheidet sich ebenfalls weder hinsichtlich der Gruppen insgesamt, noch hinsichtlich der Geschlechter zwischen oder innerhalb der Gruppen signifikant (keine Darstellung der Daten).

**Tabelle 9: irET-1- und irBig-ET-1-Konzentrationen im Plasma von MH-7777-tragenden Buffalo-Ratten sowie von gesunden Kontrollen.** Angaben in pmol irET-1 bzw. irBig-ET-1 pro l Plasma. Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE). Je Gruppe n=11 (MH-7777 5♂ und 6♀, Kontrolle 4♂ und 7♀). Unterschiede zwischen Gruppen und Geschlechtern sind nicht signifikant.

	irET-1 (pmol/l)			irBig-ET-1 (pmol/l)		
	Gesamt	♂	♀	Gesamt	♂	♀
<b>MH-7777</b>	24,3 $\pm$ 6,1	14,5 $\pm$ 2,0	32,1 $\pm$ 9,8	16,6 $\pm$ 2,2	12,9 $\pm$ 5,0	19,7 $\pm$ 3,9
<b>Kontrolle</b>	24,0 $\pm$ 3,9	25,1 $\pm$ 3,2	23,5 $\pm$ 5,6	15,7 $\pm$ 2,3	14,3 $\pm$ 4,8	16,5 $\pm$ 2,5

### 3.1.2 Proteinkonzentrationen in Hepatom- und Lebergewebe

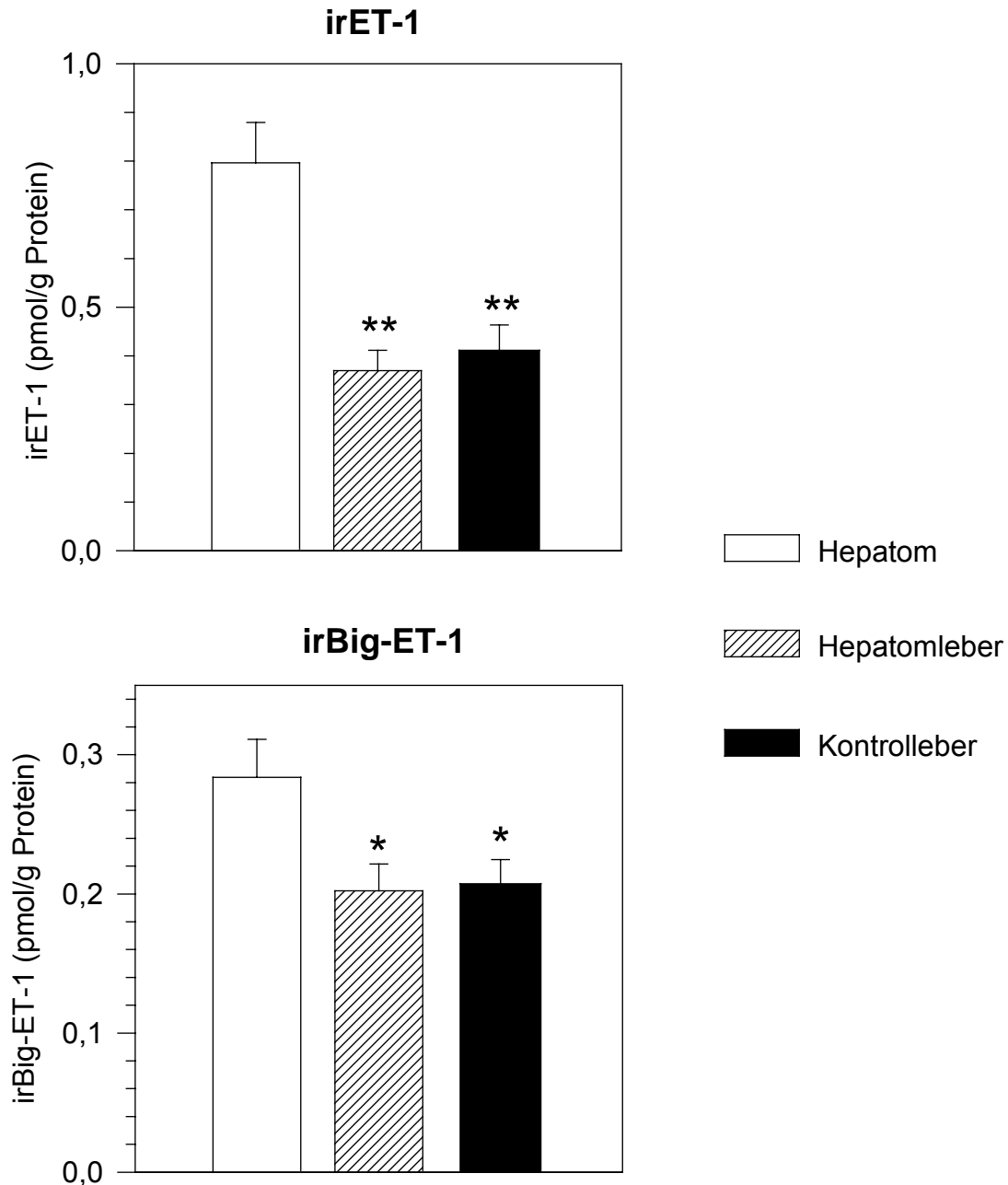
Die Proteinkonzentrationen in Gewebeextrakt aus annähernd gleichen Mengen aufgearbeitetem Gewebe sind im Hepatom signifikant geringer als in Lebergewebe. Außerdem ist der Proteingehalt in der Leber von hepatomtragenden Tieren (Hepatomleber) im Vergleich zu Leber aus gesunden Kontrolltieren (Kontrolleber) leicht, aber statistisch signifikant vermindert (*siehe Tabelle 10*).

**Tabelle 10: Proteinkonzentrationen der zur Bestimmung von Gewebe-ET-1 und -Big-ET-1 aufgearbeiteten Gewebeextrakte.** Angaben in g/l Gewebeextrakt. Für Hepatom gilt  $p < 0,00000001$  in bezug auf die beiden anderen Werte, für Hepatomleber vs. Kontrolleber gilt  $p < 0,01$ . Errechnung der p-Werte im unverbundenen (Kontrolleber vs. Hepatom und Hepatomleber) bzw. verbundenen (Hepatom vs. Hepatomleber) t-Test. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ( $\pm$  SE). Je Gruppe  $n=11$ .

Proteinkonzentration (g/l Gewebeextrakt)		
Hepatom	Hepatomleber	Kontrolleber
16,2 $\pm$ 0,52	29,2 $\pm$ 0,38	30,8 $\pm$ 0,31

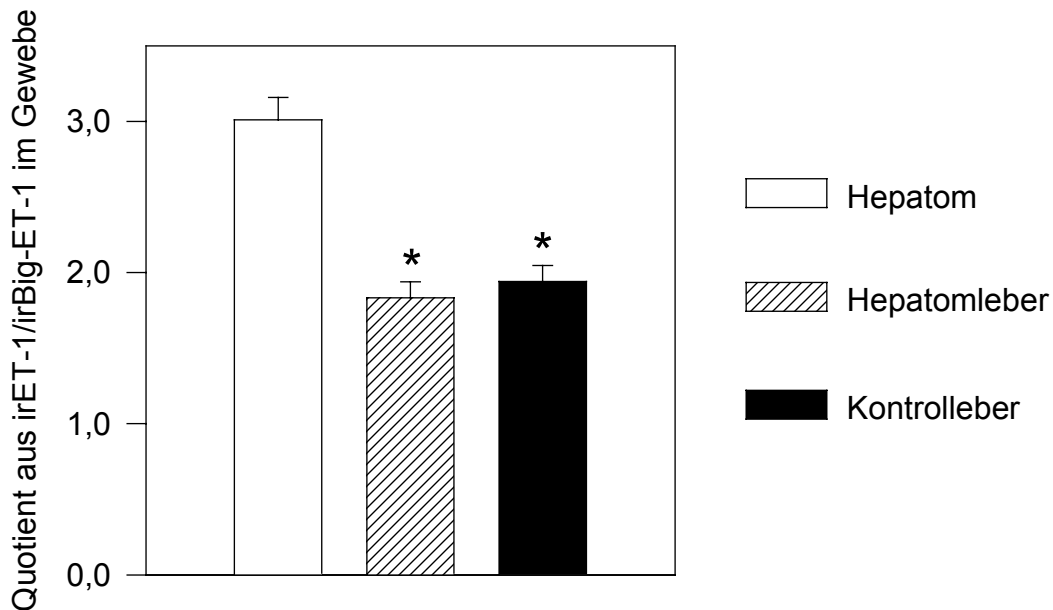
### 3.1.3 Gewebekonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1

Sowohl die irET-1- wie auch die irBig-ET-1-Gewebekonzentration ist nach 21 Tagen im MH-7777 signifikant gegenüber Lebergewebe von hepatomtragenden (Hepatomleber) und gesunden Tieren (Kontrolleber) erhöht (um durchschnittlich 93,7% [irET-1] bzw. 37,0% [irBig-ET-1] bezogen auf Kontrolleber). Zwischen Lebergewebe von hepatomtragenden und gesunden Buffalo-Ratten besteht statistisch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der irET-1- und irBig-ET-1-Konzentrationen (*siehe Abb. 6*).



**Abb. 6: Gewebekonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 in Hepatom, Hepatomleber (Leber von hepatomtragenden Buffalo-Ratten) und Kontrolleber.** Angaben in pmol irET-1 bzw. irBig-ET-1 bezogen auf g Protein im Gewebeextrakt. Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus  $n=11$  je Kategorie. \* $p<0,05$  \*\* $p<0,001$  vs. Hepatom im unverbundenen (Kontrolleber vs. Hepatom) bzw. verbundenen (Hepatomleber vs. Hepatom) t-Test.

Auch der Quotient von irET-1 zu irBig-ET-1 ist im Hepatomgewebe bezogen auf die Proteinmenge signifikant höher als in Hepatomleber und Kontrolleber. Bezogen auf die Hepatomleber ist der Quotient im Hepatom um durchschnittlich 64,2% erhöht, bezogen auf die Kontrolleber um durchschnittlich 55,0% (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: Quotient von irET-1 durch irBig-ET-1 in Hepatom, Hepatomleber (Leber von hepatomtragenden Buffalo-Ratten) und Kontrolleleber.** Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus  $n=11$  je Kategorie. \* $p<0,0001$  vs. Hepatom im unverbundenen (Kontrolleleber vs. Hepatom) bzw. verbundenen (Hepatomleber vs. Hepatom) t-Test.

Nach Geschlechtern aufgeschlüsselt stellen sich die gleichen Ergebnisse wie folgt dar (siehe Tabelle 11): Für die einzelnen Werte bestehen im Hepatom keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Hinsichtlich der irET-1-Konzentration in Hepatomleber und hinsichtlich aller Parameter in Kontrolleleber sind signifikant höhere Werte bei weiblichen Tieren zu verzeichnen.

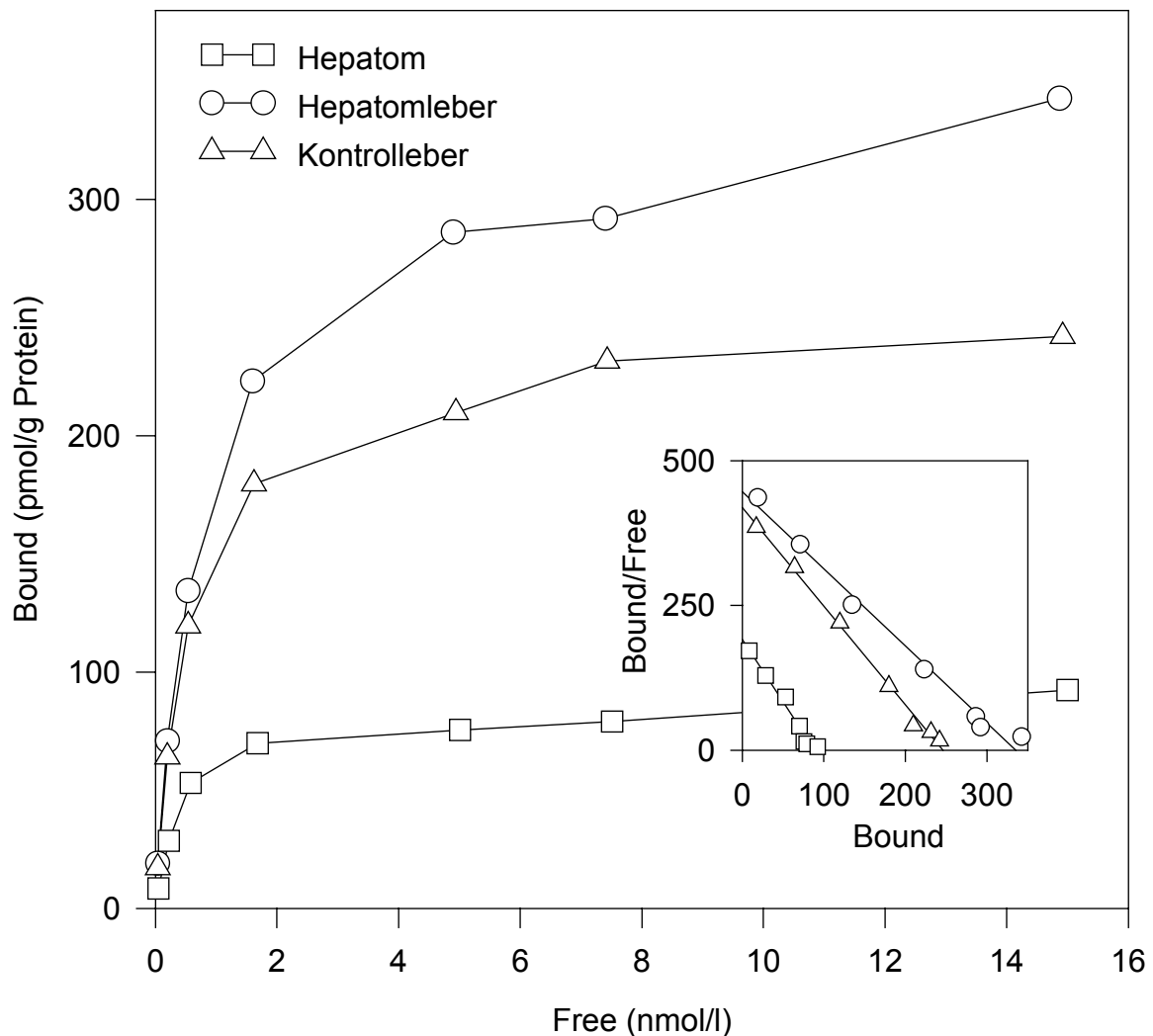
**Tabelle 11: Geschlechtsspezifische Darstellung der Gewebekonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 und des Quotienten irET-1/Big-ET-1 in Hepatom, Hepatomleber (Leber von hepatomtragenden Buffalo-Ratten) und Kontrolleleber.** Angaben in pmol irET-1 bzw. irBig-ET-1 bezogen auf g Protein im Gewebeextrakt. Der Quotient hat keine Einheit. Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus mindestens  $n=4$  je Wert (Hepatom und Hepatomleber 5♂ und 6♀, Kontrolleleber 4♂ und 7♀). \* $p<0,05$  vs. gleicher Parameter der männlichen Tiere im unverbundenen t-Test.

	Hepatom		Hepatomleber		Kontrolleleber	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<b>irET-1</b>	0,83 $\pm$ 0,14	0,77 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,06*	0,27 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,06*
<b>irBig-ET-1</b>	0,25 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02*
<b>Quotient</b>	3,26 $\pm$ 0,24	2,80 $\pm$ 0,16	1,62 $\pm$ 0,09	2,01 $\pm$ 0,15	1,68 $\pm$ 0,12	2,12 $\pm$ 0,11*

## 3.2 ET-Rezeptoren in Hepatom- und Lebergewebe

### 3.2.1 ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte in Hepatom- und Lebergewebe

Aus den *Scatchard*-Rezeptor-Bindungsstudien resultieren Sättigungskurven. In diesen wird das nicht spezifisch gebundenen ET-1 (Abszisse) dem spezifisch gebundenen ET-1 (entspricht den gebildeten Hormon-Rezeptor-Komplexen), bezogen auf das Gesamtprotein (Ordinate), gegenübergestellt (*siehe Abb. 8*).

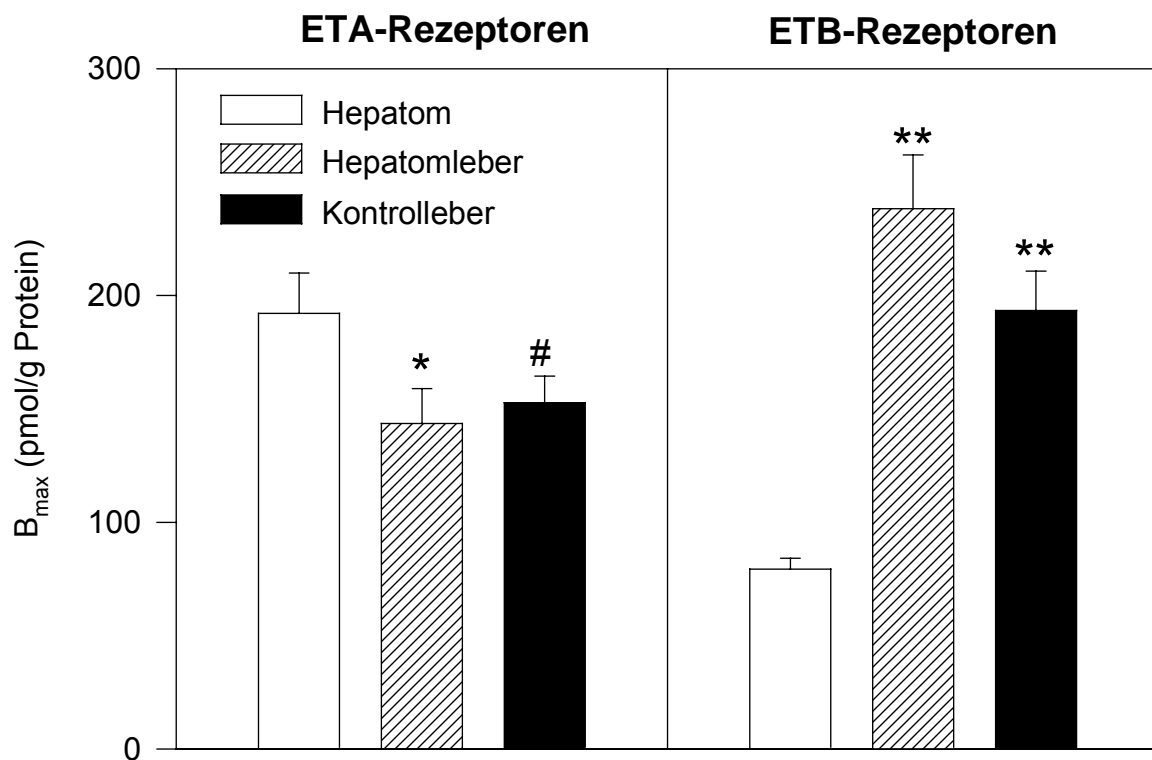


**Abb. 8: Spezifische Bindung von [<sup>125</sup>]ET-1 und unmarkiertem ET-1 bei Anwesenheit von 10 mol/l BQ 123 (ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist) im Bindungsansatz zur Analyse der ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte.** Gezeigt ist eine typische Sättigungskurve an MH-7777-Gewebe, Hepatomleber (Leber von einer hepatomtragenden Buffalo-Ratte) und Kontrolleber. *Free*: Konzentration des gesamten nicht spezifisch gebundenen ET-1 in nmol/l; *Bound*: Konzentration des gesamten spezifisch gebundenen ET-1 (entspricht der Konzentration der gebildeten Hormon-Rezeptor-Komplexe) in pmol pro g Protein im Ansatz. Das *Insert* zeigt die lineare Umformung nach *Scatchard*. Alle Daten sind Mittelwerte aus drei parallelen Bestimmungen.

Um die maximale Bindungskapazität ( $B_{\max}$ -Wert, entspricht der Rezeptordichte) und die Affinität der Bindungsstellen ( $K_D$ -Wert) zu berechnen, wird die lineare Umformung nach *Scatchard* durchgeführt (siehe *Insert Abb. 8*).

Falls es sich um eine homogene Rezeptorpopulation ohne positive oder negative Kooperativität handelt, führt diese Darstellung zu einer Geraden. Die *Scatchard*-transformation der Bindungsdaten für den  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptor in Hepatom, Hepatomleber (Leber von hepatomtragenden Buffalo-Ratten) und Kontrolleber ergaben stets einen linearen Zusammenhang zwischen *Bound/Free* und *Bound*. Dies bedeutet, daß jeweils nur ein Typ von  $ET_A$ - bzw.  $ET_B$ -Rezeptoren in den Geweben vorhanden ist.

Der  $B_{\max}$ -Wert entspricht dem Schnittpunkt mit der Abszisse, der  $K_D$ -Wert ist der negative Kehrwert der Steigung.



**Abb. 9:  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptordichte in Hepatom, Hepatomleber und Kontrolleber.** Angegeben als  $B_{\max}$  in pmol Rezeptoren pro g Protein im Ansatz, abgelesen aus den Sättigungskurven nach *Scatchard*-transformation. Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus jeweils  $n=11$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,0001$ , # $p=0,08$  jeweils vs. Hepatom der gleichen Rezeptorart im unverbundenen (Kontrolleber) bzw. verbundenen t-Test (Hepatomleber).

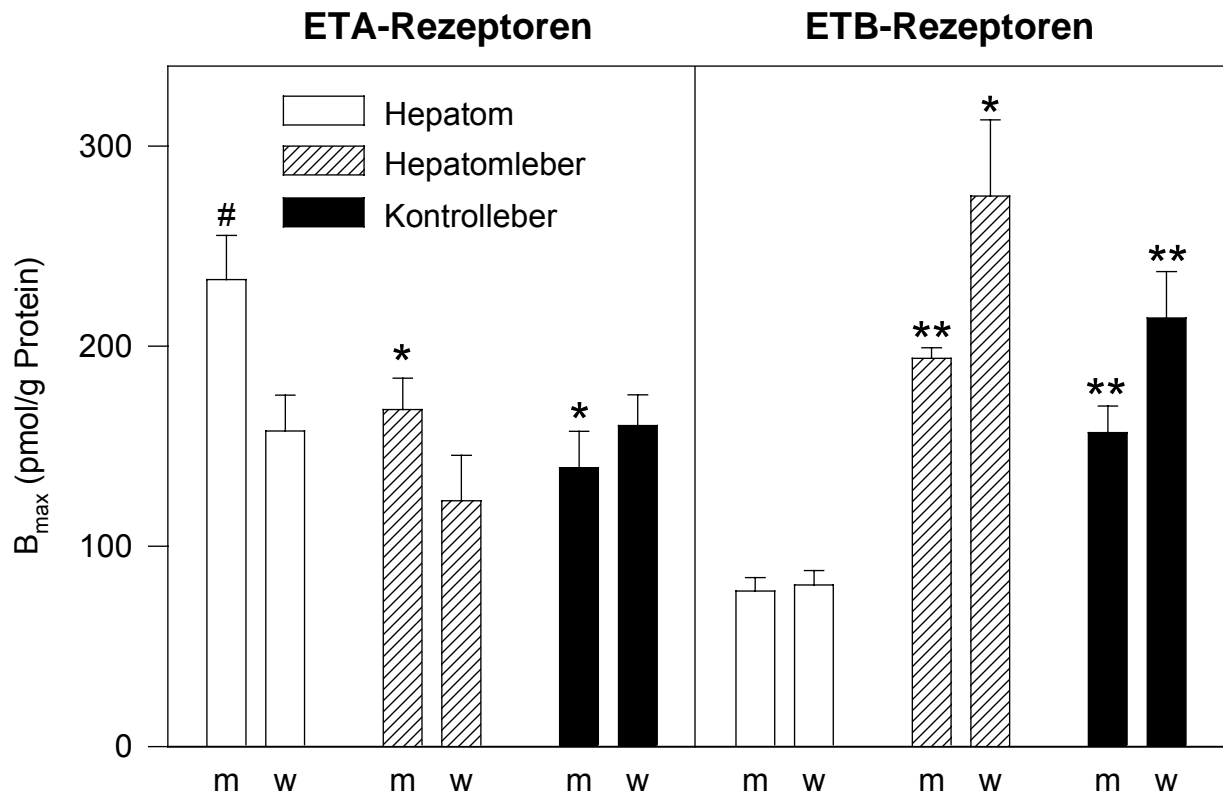
Die Auswertung der  $B_{\max}$ -Werte zeigt im Hepatomgewebe eine signifikant höhere  $ET_A$ -Rezeptordichte als in der Hepatomleber (Leber von hepatomtragenden Buffalo-Ratten). Im Vergleich zu Hepatomleber ergeben die Werte eine Zunahme der  $ET_A$ -Rezeptordichte um 33,8%, im Vergleich zu Kontrolleber um 25,8%. Das Signifikanzniveau



von Hepatom zu Kontrolleber liegt mit  $p=0,08$  geringfügig über der Signifikanzschwelle. Es gibt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Hepatomleber (siehe Abb. 9).

Im Gegensatz zur  $ET_A$ -Rezeptordichte ist die  $ET_B$ -Rezeptordichte im Hepatom im Vergleich zu den beiden anderen Geweben hochsignifikant erniedrigt. Bezogen auf Hepatomleber ist die  $ET_B$ -Rezeptordichte im Hepatom um 66,7%, bezogen auf Kontrolleber um 59,0% herabgesetzt.

Damit ist die  $ET_B/ET_A$ -Rezeptor-Relation im MH-7777-Gewebe mit 0,41 am niedrigsten, verglichen mit 1,27 in Kontrolleber und 1,66 in Leber von hepatomtragenden Buffalo-Ratten.



Aufgeschlüsselt nach Geschlechtern, zeigt sich ausschließlich hinsichtlich der  $ET_A$ -Rezeptoren im Hepatomgewebe eine signifikante Differenz zwischen männlichen und weiblichen Tieren (siehe Abb. 10). Die  $ET_A$ -Rezeptordichte ist bei weiblichen Tieren im

Hepatom nicht signifikant gegenüber den beiden anderen Geweben erhöht, wie dies bei den männlichen Tieren und in der Gesamtbetrachtung der Fall ist. Bezüglich der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren gibt es im Vergleich zur nicht nach Geschlechtern getrennten Betrachtungsweise keine Unterschiede.

### 3.2.2 Bindungsaffinität der ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren

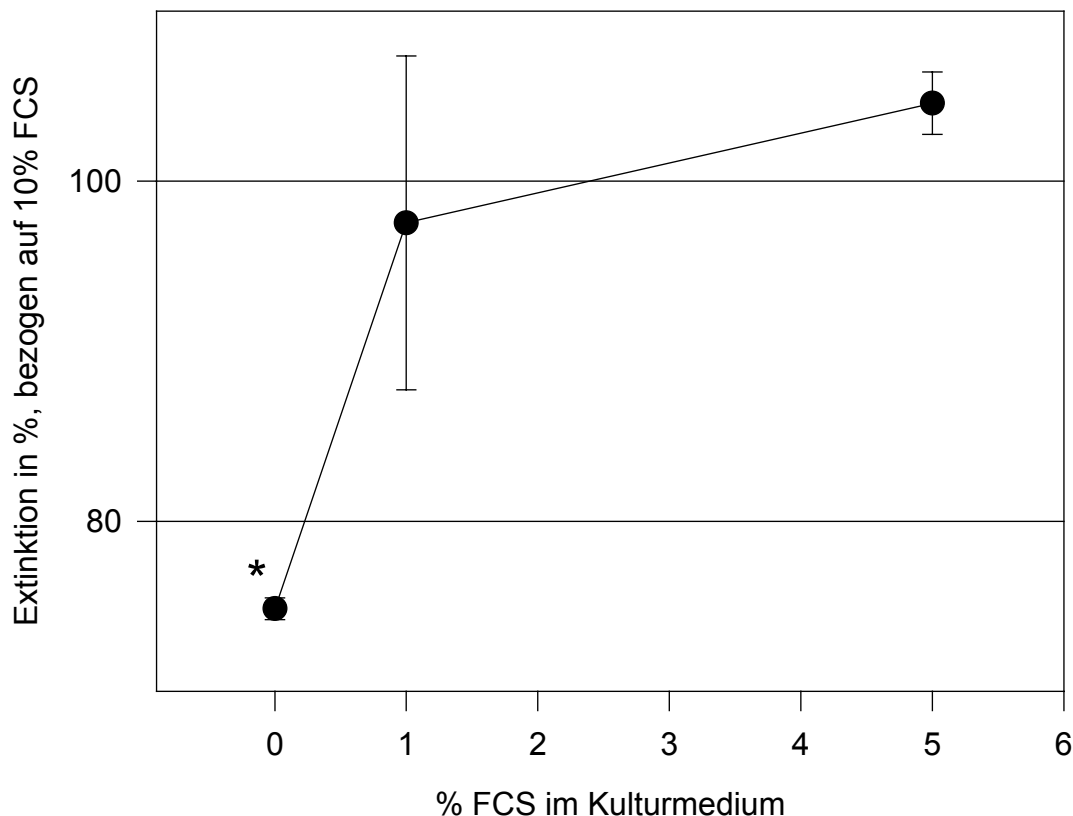
Die Bindungsaffinität der ET<sub>A</sub>-Rezeptoren ist in allen Geweben signifikant höher als die der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren. Betrachtet man jeden der zwei Rezeptortypen für sich, so gibt es zwischen den drei untersuchten Gewebetypen wenig Unterschiede. Lediglich die Affinität des ET<sub>A</sub>-Rezeptors in MH-7777-Gewebe ist gegenüber Kontrolleber statistisch signifikant erniedrigt. Die Affinität der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren ist in den drei Gewebetypen nicht signifikant unterschiedlich (*siehe Tabelle 12*). Die nach Geschlechtern getrennte Auswertung ergibt knapp signifikante Unterschiede für etwas höhere K<sub>D</sub>-Werte der ET<sub>A</sub>-Rezeptoren in Kontrolleber und der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren in Hepatomgewebe von männlichen Tieren.

**Tabelle 12: Bindungsaffinitäten der ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren in MH-7777-Gewebe, Hepatomleber (Leber von hepatomtragenden Buffalo-Ratten) und Kontrolleber.** Angabe der Bindungskonstanten K<sub>D</sub> (entspricht der Rezeptorbindungsaffinität) in pmol/l, abgelesen aus den Sättigungskurven nach *Scatchard*-Transformation. Die Daten sind Mittelwerte (± SE) aus jeweils n=11. \*p<0,01 vs. ET<sub>A</sub>-Rezeptoraffinität im gleichen Gewebe im verbundenen t-Test, #p<0,05 vs. ET<sub>A</sub>-Rezeptoraffinität in Kontrolleber im unverbundenen t-Test. +p<0,05 männliche vs. weibliche Tiere im unverbundenen t-Test (höhere Werte bei männlichen Tieren).

K <sub>D</sub> (pmol/l)	Hepatom	Hepatomleber	Kontrolleber
ET <sub>A</sub> -Rezeptoraffinität	757 ± 62 <sup>#</sup>	992 ± 121	1093 ± 128 <sup>+</sup>
ET <sub>B</sub> -Rezeptoraffinität	470 ± 25 * <sup>+</sup>	444 ± 41 *	533 ± 49 *

### 3.3 Wachstumsverhalten der MH-7777-Zellen bei Inkubation mit ET-1 und ET-Rezeptorantagonisten

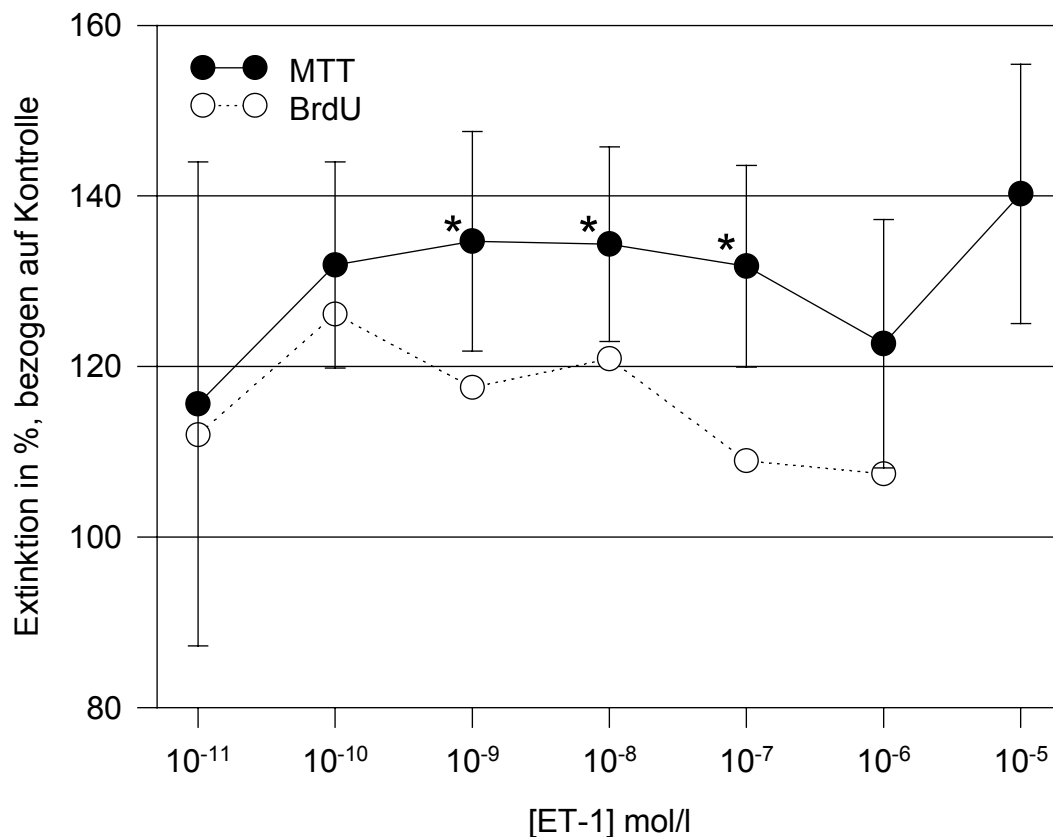
Im Vorversuch zur Klärung der FCS-abhängigkeit von MH-7777-Zellen ergab sich eine verminderte *MTT*-Reduktion durch Absenkung der FCS-Konzentration. Bei 5% und 1% FCS im Standardkulturmedium bewegen sich die durchschnittlichen Extinktionen (die sich proportional zur Zellmenge verhalten) mit 104,6% bzw. 97,5% noch dicht bei dem Kontrollwert der durchschnittlichen Extinktion bei 10% FCS im Medium (Kontrolle, gesetzt: 100%). In FCS-freiem Medium ist die durchschnittliche Extinktion nach einem Tag mit 74,9% der Kontrolle signifikant geringer (siehe Abb. 11).



**Abb. 11: Wachstumsverhalten von MH-7777-Zellen in Kulturmedien mit verschiedenen FCS-Konzentrationen.** Zellmengen von MH-7777-Zellen nach einem Tag Wachstum in Kulturmedien mit 0%, 1% und 5% FCS. Messung der Zellmengen über *MTT*-Assays. Angaben in Prozent der Extinktion bezogen auf die Extinktion bei einer Konzentration von 10% FCS im Kulturmedium. Errechnung der relativen Extinktion nur innerhalb des gleichen Versuchsdurchgangs. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ( $\pm$  SD) aus zwei Versuchsdurchgängen ( $n=2$ ) mit jeweils zwölf parallelen Bestimmungen. \* $p<0,05$  vs. Kontrolle (100%) im verbundenen t-Test.

Die Ergebnisse aus den Proliferationsassays nach ET-1-Stimulation waren nur unter Vorbehalt auszuwerten, da es extreme Schwankungen der Werte zwischen den einzel-

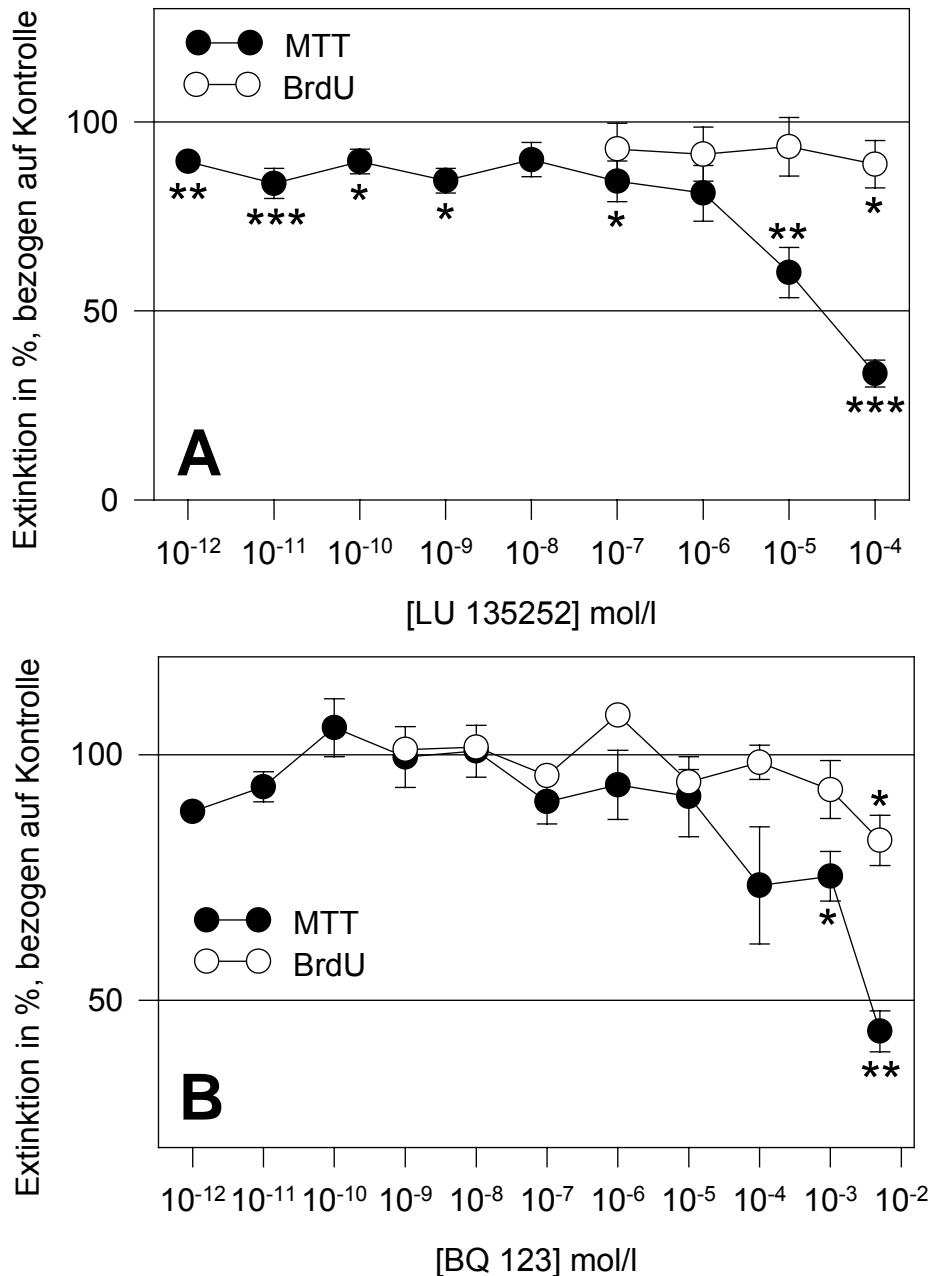
nen Versuchsdurchgängen gab. Versuche, diese Schwankungen durch Wiederholungen zu eliminieren, schlugen fehl. Innerhalb der einzelnen Versuchsdurchgänge liegen die Ergebnisse für die verschiedenen ET-1-Verdünnungsstufen allerdings meist dicht beieinander. Trotzdem wurden in Abb. 12 Mittelwerte der Ergebnisse aus den *MTT*-Assays gebildet, die relativ gut mit den Werten des einzigen durchgeführten *BrdU*-Assays übereinstimmen. Das Maximum liegt für den *MTT*-Assay bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l ET-1, mit durchschnittlich 134,7 % der Extinktion unbehandelter Kontrollen. Dieser Unterschied gegenüber den Kontrollwerten ist auch statistisch signifikant, ebenso wie die Unterschiede an den beiden nächsthöheren Konzentrationsstufen. Das Maximum im *BrdU*-Assay liegt mit 126,1% bei einer Konzentration von  $10^{-10}$  mol/l.



**Abb. 12: Wachstumsverhalten von MH-7777-Zellen bei verschiedenen ET-1-Konzentrationen.** Zellmengen von MH-7777-Zellen nach einem Tag Wachstum in Kulturmedien mit den angegebenen ET-1-Konzentrationen. Messung der Zellmengen über *MTT*- und *BrdU*-Proliferationsassays. Angaben in Prozent der Extinktion bezogen auf die Extinktion ohne ET-1-Zugabe. Errechnung der relativen Extinktion nur innerhalb des gleichen Versuchsdurchgangs. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus  $n=12$  für den *MTT*-Assay. Jeder Versuchsdurchgang besteht seinerseits aus fünf parallelen Bestimmungen jedes Wertes. Es wurden nur ein *BrdU*-Assay durchgeführt. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (100%) im verbundenen t-Test.

Inkubation der MH-7777-Zellen mit den ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten *LU 135252* oder *BQ 123* bewirkt bei Messung mit dem *MTT*-Assay in höheren Konzentrationen eine

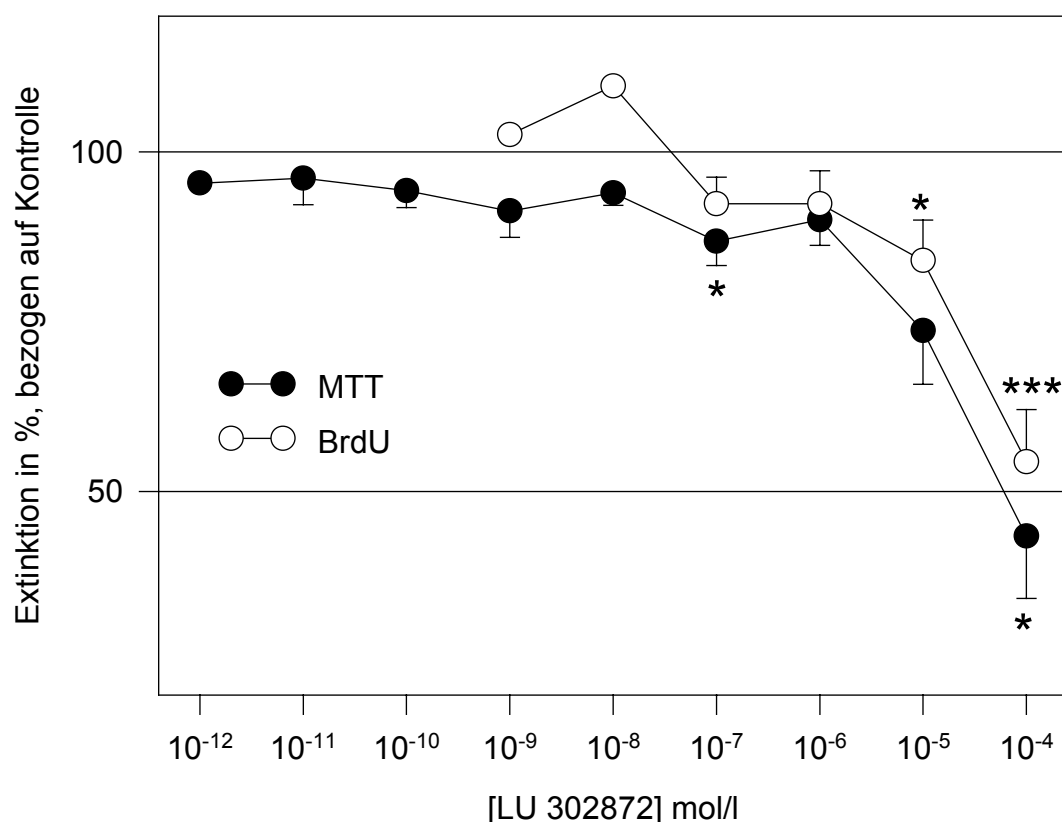
deutliche, statistisch signifikante Verminderung der *MTT*-Reduktion (bzw. eine Proliferationshemmung). Dieses Ergebnis kann durch den *BrdU*-Assay nicht bestätigt werden. Dieser zeigt lediglich in der höchsten Konzentrationsstufe eine leichte, aber ebenfalls statistisch signifikante Tendenz in Richtung Wachstumshemmung an (siehe Abb. 13).



**Abb. 13: Wachstumsverhalten von MH-7777-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten. A: LU 135252. B: BQ 123.** Zellmengen von MH-7777-Zellen nach einem Tag Wachstum in Kulturmedien mit den angegebenen Substanz-Konzentrationen. Messung der Zellmengen über *MTT*- und *BrdU*-Proliferationsassays. Angaben in Prozent der Extinktion bezogen auf die Extinktion ohne Antagonisten-Zugabe. Errechnung der relativen Extinktion nur innerhalb des gleichen Versuchsdurchgangs. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus  $n=8$  für den *MTT*-Assay, bzw. an den vier höchsten Konzentrationen  $n=5$  für den *BrdU*-Assay. Jeder Versuchsdurchgang besteht seinerseits aus fünf parallelen Bestimmungen jedes Wertes. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  vs. Kontrolle (100%) im verbundenen t-Test.

Eine Hemmung der *MTT*-Reduktion auf 50% wird durch Konzentrationen von ca.  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l *LU 135252* bzw. ca.  $4 \times 10^{-3}$  mol/l *BQ 123* erreicht.

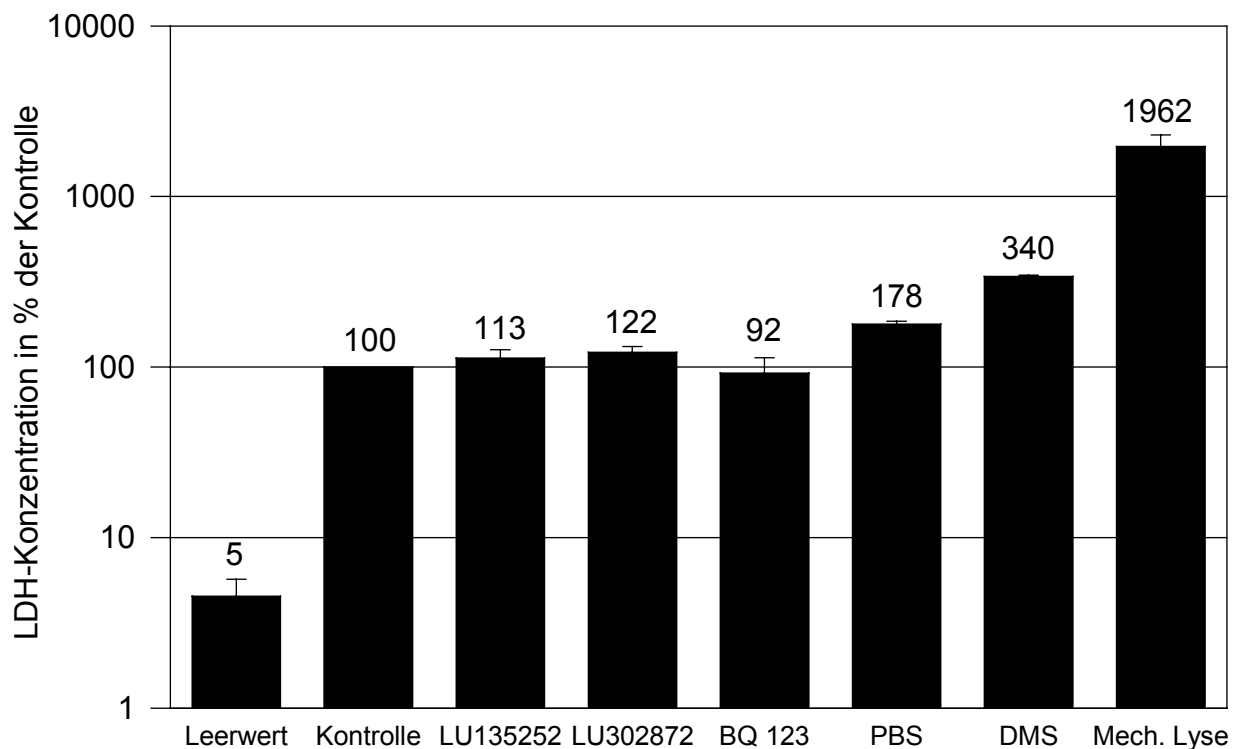
Beim kombinierten  $ET_{A/B}$ -Rezeptorantagonisten *LU 302872* liegt die durchschnittlich benötigte Konzentration zur Hemmung der *MTT*-Reduktion auf 50% bei ca.  $6 \times 10^{-5}$  mol/l. Auch diese Substanz ruft bei Messung mit dem *MTT*-Assay eine klare, statistisch signifikante Hemmung der Extinktion im oberen getesteten Konzentrationsbereich hervor. Der Effekt lässt sich im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Inkubationen mit  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten durch Messung des DNA-Einbaus mit dem *BrdU*-Assay bestätigen (siehe Abb. 14).



**Abb. 14: Wachstumsverhalten von MH-7777-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen des kombinierten  $ET_{A/B}$ -Rezeptorantagonisten *LU 302872*.** Zellmengen von MH-7777-Zellen nach einem Tag Wachstum in Kulturmedien mit den angegebenen Antagonisten-Konzentrationen. Messung der Zellmengen über *MTT*- und *BrdU*-Proliferationsassays. Angaben in Prozent der Extinktion bezogen auf die Extinktion ohne Antagonisten-Zugabe. Errechnung der relativen Extinktion nur innerhalb des gleichen Versuchsdurchgangs. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus  $n=6$  für den *MTT*-Assay, bzw. an den vier höchsten Konzentrationen  $n=5$  für den *BrdU*-Assay. Jeder Versuchsdurchgang besteht seinerseits aus fünf parallelen Bestimmungen jedes Wertes. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle (100%) im verbundenen t-Test.

### 3.3.1 LDH-Bestimmung

Bei der LDH-Bestimmung im Überstand der mit verschiedenen Substanzen inkubierten MH-7777-Zellen (zum Ausschluß von toxischen Effekten) zeigt sich für die ET-Rezeptorantagonisten in der höchsten eingesetzten Konzentration ein dicht bei den Kontrollen liegendes LDH-Niveau. Die Werte der Positivkontrollen (Austausch des Mediums durch PBS, Zugabe von *DMSO* sowie mechanische Lyse) sind deutlich erhöht (siehe Abb. 15).



**Abb. 15: LDH-Konzentrationen im Überstand von MH-7777-Zellen nach einem Tag Inkubation mit den angegebenen Substanzen bzw. nach mechanischer Lyse.** Die Kontrollen wurden als 100% gesetzt. Alle Werte sind dargestellt in Prozent der Kontrollen und auf einer logarithmischen Ordinate aufgetragen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus mindestens drei unabhängigen Versuchsdurchgängen ( $n=3$ ). Statistische Tests wurden aufgrund der zu geringen Anzahl von Versuchsdurchgängen nicht durchgeführt.

### 3.3.2 Trypanblau-Färbung

In der Auswertung der Trypanblau-Färbung ergeben sich nach abschätzender Quantifizierung der bläulich angefärbten Zellen pro *Well* nach 24stündiger Inkubation der MH-7777-Zellen mit verschiedenen Substanzen folgende Ergebnisse:

In allen Konzentrationsstufen der ET-1-stimulierten Ansätze erscheinen die Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zahlreicher und vitaler. Es sind verstärkt Mitosen zu

erkennen, angefärbte Zellen fehlen fast völlig. Die Positivkontrolle mit PBS anstelle von Medium weist eine deutlich erhöhte Zahl bläulich gefärbter Zellen auf, während im DMSO-behandelten Ansatz nahezu ausschließlich bläuliche und damit geschädigte Zellen zu erkennen sind. In keinem Fall bestehen Unterschiede bezüglich der Anfärbbarkeit durch Trypanblau-Lösung zwischen Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen einer gleichen Substanz inkubiert werden. Insbesondere ist keinerlei Tendenz zu verstärkter Anfärbbarkeit bei höherer ET-Rezeptorantagonisten-Konzentration zu beobachten (keine Darstellung von Daten im einzelnen). Wegen der fehlenden konzentrationsabhängigen Unterschiede wurde ein Mittelwert der in drei unabhängig voneinander durchgeführten Durchgängen festgestellten Werte aller untersuchten Konzentrationen einer Substanz gebildet (*siehe Tabelle 13*).

**Tabelle 13: Anteil der durch Trypanblau angefärbten Zellen nach Inkubation mit den angegebenen Substanzen.** Angaben in Einheiten der semiquantitativen optischen Quantifizierungsskala von 0 bis 5 (keine bis alle Zellen bläulich angefärbt). Die Daten sind Mittelwerte der in drei unabhängig voneinander durchgeführten Durchgängen entsprechend der semiquantitativen optischen Quantifizierungsskala zugeordneten Werte aller untersuchten Konzentrationen einer Substanz. Wegen des semiquantitativen Charakters dieser Skala wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt.

ET-1	Kontrolle	LU 135252	LU 302872	BQ 123	PBS	DMSO
0,54	1,75	1,67	1,42	1,75	3,3	5,0

### 3.3.3 ET-1-Bestimmung

Die Auswertung der Ergebnisse des ET-1-Assays ergab irET-1 Konzentrationen von 9,81 ( $\pm 3,9$ ) pmol/l für die Kontrollen und 6,5 ( $\pm 1,8$ ) pmol/l irET-1 im Kulturüberstand LU 135252-behandelter Zellen. Dies entspricht irET-1-Konzentrationen von ca.  $10^{-11}$  mol/l. Die großen Standardfehler ergeben sich aus unterschiedlichen im Ansatz verwendeten Zellzahlen. Auf absolute Zellzahlen bezogen ergibt sich in 24 Stunden eine irET-1 Produktion von 10,3 ( $\pm 1,7$ ) fmol/ $10^6$  Zellen für unbehandelte Zellen und 7,1 ( $\pm 0,19$ ) fmol/ $10^6$  Zellen für LU 135252 - inkubierte Zellen ( $10^{-4}$  mol/l LU 135252). Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus n=3.



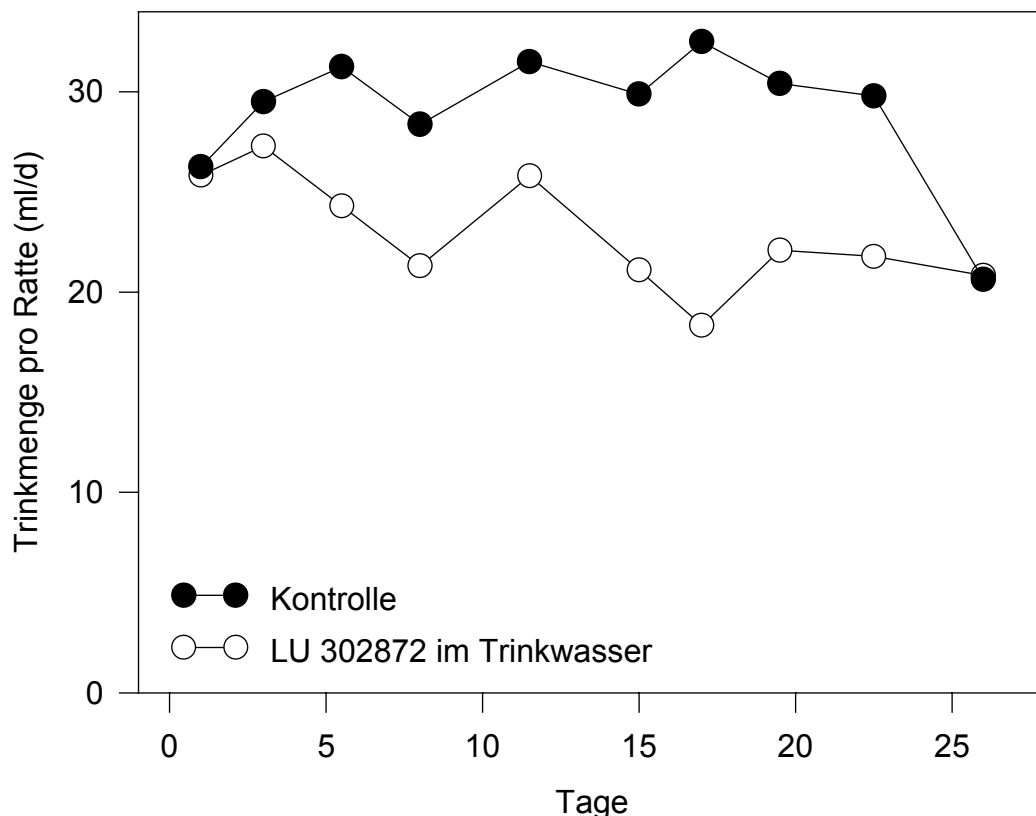
### 3.4 Behandlungsversuch des MH-7777 mit *LU 302872*

#### 3.4.1 Vorversuch zur Trinkmengenbestimmung

Der Vorversuch zur Bestimmung der Trinkmenge von gesunden Buffalo-Ratten sowie die Untersuchung des Einflusses von *LU 302872* im Trinkwasser führte zu folgenden Ergebnissen:

Die durchschnittliche Trinkmenge der gesunden Tiere (Kontrollen) liegt bei  $29,0 \pm 1,1$  (SE) ml pro Ratte pro Tag. Die Ratten, die statt Leitungswasser *LU 302872*-Lösung bekommen, nehmen zu Beginn des Versuchs noch annähernd dieselbe durchschnittliche Trinkmenge wie die Kontrollen zu sich. Im Laufe des Versuchs sinkt diese dann jedoch etwas ab und beträgt über die gesamte Versuchsdauer von 28 Tagen hinweg durchschnittlich  $22,9 \pm 0,9$  (SE) ml pro Ratte pro Tag (siehe Abb. 16).

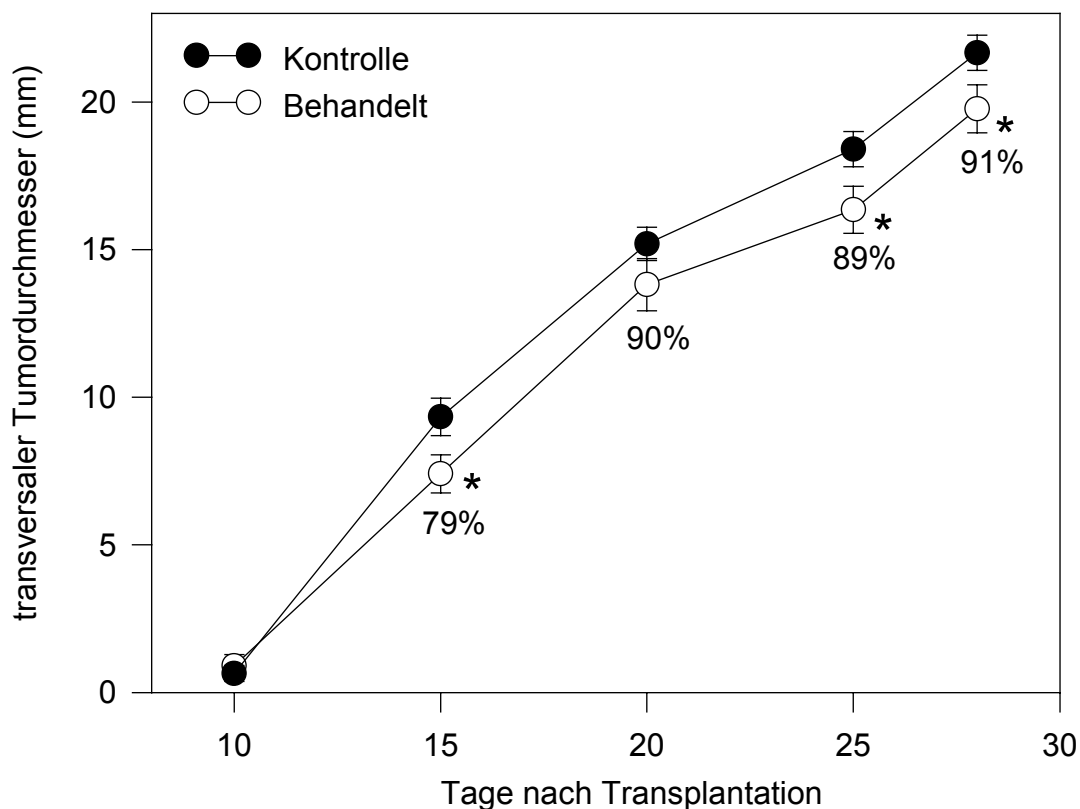
Hinsichtlich des Gewichts gab es in beiden Gruppen keinerlei signifikante Änderungen im Verlauf des Versuchs (keine Darstellung der Daten).



**Abb. 16: Durchschnittliche Trinkmengen von gesunden Buffalo-Ratten, die entweder Leitungswasser (Kontrollen), oder eine *LU 302872*-Lösung bekommen.** Die Daten sind als über alle Tiere gemittelte Werte erhoben worden, daher ist keine Angabe von SE möglich.  $n=4$  für die Kontrollgruppe,  $n=7$  für die *LU 302872*-Gruppe.

### 3.4.2 Wachstumsverhalten des MH-7777 bei Behandlung

Die regelmäßige Überwachung des Wachstumsverlaufs der *Morris*-Hepatome durch Messung des transversalen Tumordurchmessers mit einer Schublehre, zeigt ein vermindertes Wachstum der Hepatome in der Gruppe der mit *LU 302872* behandelten Buffalo-Ratten. Dieses verminderte Wachstum im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (siehe auch Abb. 17) ist über den gesamten Verlauf betrachtet (Tag 10 bis Tag 28) in der „*Analysis of variance*“-Berechnung (ANOVA) statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

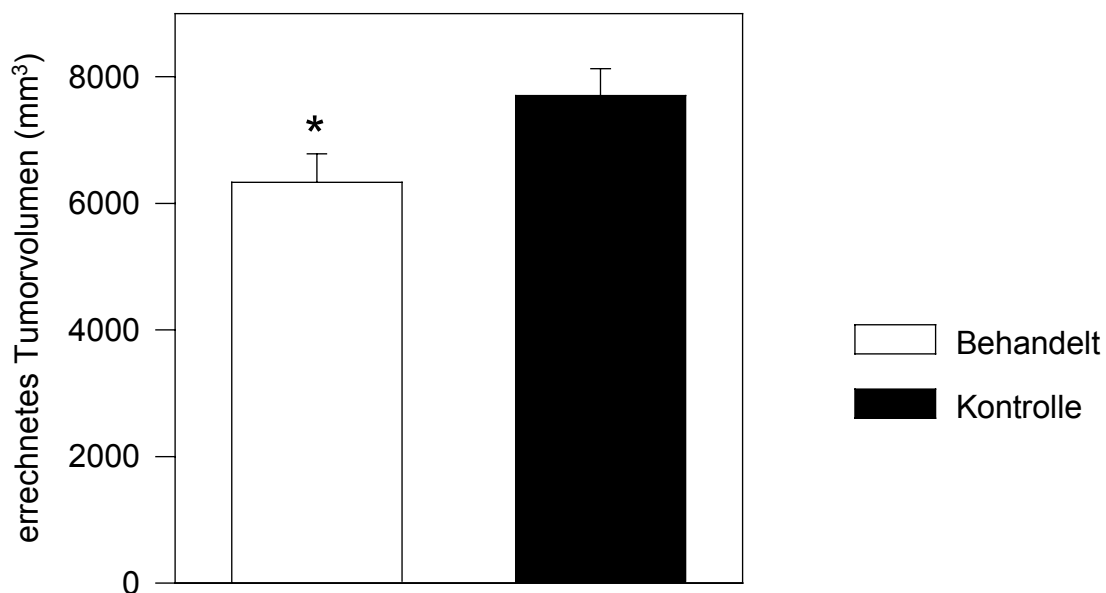


**Abb. 17: Größenzunahme des MH-7777 in Buffalo-Ratten. Mit *LU 302872* behandelte Tiere vs. unbehandelte Kontrollen.** Angabe des mit einer Schublehre gemessenen transversalen Tumordurchmessers in mm. Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus jeweils  $n=38$  (je 19 Tiere mit je einem Hepatom rechts und links). Die Prozentangaben drücken die durchschnittliche Tumorgöße der behandelten Gruppe in Prozent der durchschnittlichen Tumorgöße der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt aus. \* $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt im unverbundenen t-Test (Vergleich, der für jedes Tier zwischen rechts und links gemittelten Werte). Der Vergleich beider Kurven in ihrer Gesamtheit ergibt in der „*Analysis of variance*“-Berechnung (ANOVA) einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem  $p < 0,05$ . Für die in positiver Richtung verlaufende Tendenz der Meßwerte innerhalb einer Gruppe ergibt sich in der ANOVA ein  $p < 0,0001$ .

Die zur Messung erforderliche Tumorgöße ist nach 10 Tagen erstmals erreicht. Zu diesem Zeitpunkt gibt es noch keine signifikanten Größendifferenzen. Die Wachstumsgeschwindigkeiten (Anstieg der Kurve) unterscheiden sich lediglich zwischen dem

10. und 15. Tag klar voneinander. Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit ist in diesem Zeitraum in der Kontrollgruppe um durchschnittlich 30,2% höher als in der behandelten Gruppe. An den vier folgenden Meßpunkten liegen die durchschnittlichen Größen der Hepatome in der behandelten Gruppe regelmäßig deutlich unter denen der Kontrollgruppe (79-91% der durchschnittlichen Größen in der Kontrollgruppe). An drei dieser Meßpunkte unterscheiden sich die durchschnittlichen Größen auch statistisch signifikant (*siehe Abb. 17*).

Am 10. Tag starb nach der Messung mit der Schublehre ein Tier aus jeder Gruppe durch die Äthernarkose. Weitere zwei Tiere pro Gruppe starben am 20. Tag in der Xylazin/Ketamin-Narkose nach der sonographischen Tumorumfangbestimmung. In allen Fällen handelte es sich um Ratten mit überdurchschnittlich großen Tumoren. Alle diese Tiere wurden aus der Berechnung der durchschnittlichen Tumorumfänge in *Abb. 17* und des durchschnittlichen Gewichts in *Abb. 20* herausgenommen. Auch in den in diesen Zusammenhängen durchgeführten statistischen Berechnungen wurden diese Tiere nicht berücksichtigt. In die einmalig stattfindenden Querschnittsuntersuchungen zur Bestimmung des Tumorumfanges am 20. und 28. Tag gingen alle zu diesen Zeitpunkten lebenden Tiere ein.

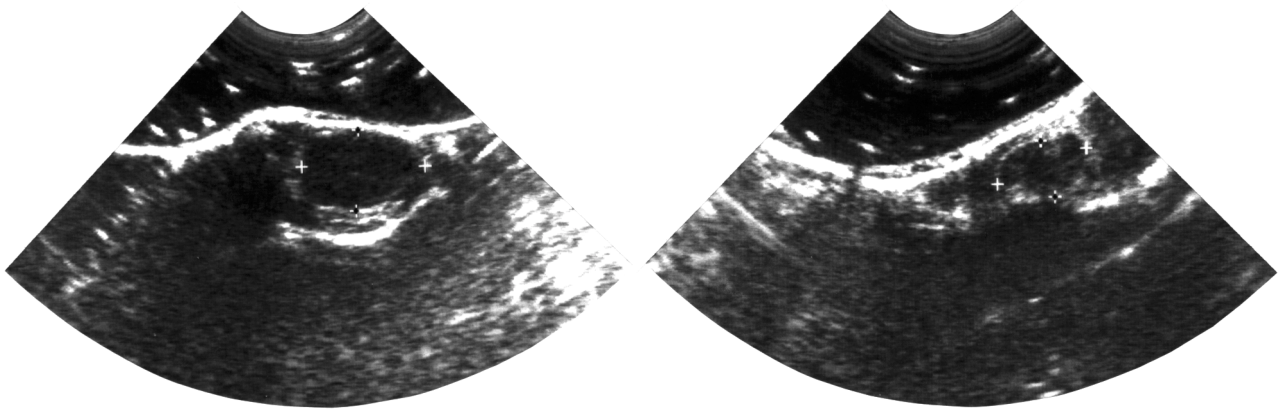


**Abb. 18: Errechnete Volumina extirpierter MH-7777 von LU 302872-behandelten Tieren und unbehandelten Kontrollen.** Die Hepatome wurden am 28. Tag nach Transplantation entnommen, mit einer Schublehre in drei Dimensionen vermessen und das angenäherte Volumen wurde errechnet. Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus jeweils  $n=38$  (je 19 Tiere mit je einem Hepatom rechts und links). \* $p<0,05$  vs. Kontrollgruppe im unverbundenen t-Test beim Vergleich der für jedes Tier zwischen rechts und links gemittelten Werte. Ein Vergleich der Einzelwerte ergibt ein Signifikanzniveau von  $p=0,068$ .

Die Hepatome wurden nach der Entnahme am 28. Tag mit der Schublehre in drei Dimensionen vermessen und das angenäherte Tumervolumen errechnet. Danach ist das durchschnittliche Tumervolumen in der Kontrollgruppe um 21,7% größer als das der behandelten Gruppe. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (*siehe Abb. 18*).

Zusätzlich zur Errechnung des Tumervolumens wurde das Gewicht der am 28. Tag nach Transplantation extirpierten Hepatome bestimmt. Das durchschnittliche Tumorgewicht in der Kontrollgruppe ist um 11,0% größer, als das der behandelten Gruppe. Allerdings ist aufgrund der niedrigeren Tiergewichte in der behandelten Gruppe (*siehe 3.4.3*) das relative Tumorgewicht in der Kontrollgruppe umgekehrt um 14,2% niedriger (*siehe Tabelle 14*).

Sonographisch konnten die Hepatome erstmals am 20. Tag nach Transplantation deutlich nachgewiesen werden (*siehe Abb. 19*).



**Abb. 19: Sonographische Aufnahmen von MH-7777 *in vivo* am 20. Tag nach Transplantation.** Gezeigt sind zwei typische Ansichten von Transversalschnitten am Oberschenkel von Buffalo-Ratten. Die runden, hypodenseren Areale zwischen den Markierungen (+) entsprechen den Hepatomen. Abmessungen der markierten Strukturen: links  $125 \times 190$  mm, rechts  $90 \times 145$  mm.

Das aus den sonographischen Werten unter der Annahme eines Rotationsellipsoids errechnete durchschnittliche Tumervolumen der Kontrollgruppe, liegt 36,4% über dem der behandelten Gruppe (*siehe Tabelle 14*).

Trotz dieser klaren Tendenzen, sind weder die Unterschiede der durchschnittlichen Werte des Tumorgewichts, noch die des sonographisch ermittelten Tumervolumens zwischen beiden Gruppen statistisch signifikant.

**Tabelle 14: Zusammenstellung von Ergebnissen der Methoden zur Beurteilung des MH-7777-Wachstums.** An den angegebenen Tagen (nach Transplantation) wurden die Volumina der Hepatome von LU 302872-behandelten Buffalo-Ratten und unbehandelten Kontrollen über verschiedene Methoden errechnet bzw. die Tumoren gewogen. Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus  $n=42$  für die sonographische Volumenbestimmung (je 21 Tiere mit je einem Hepatom rechts und links),  $n=38$  für die Volumenbestimmung mit der Schublehre und das absolute Tumorgewicht (je 19 Tiere mit je einem Hepatom rechts und links) sowie  $n=19$  für das relative Tumorgewicht (je 19 Tiere, Summe der individuellen Tumorgewichte rechts und links). \* $p<0,05$  vs. Kontrollgruppe im unverbundenen t-Test (Vergleich der für jedes Tier zwischen rechts und links gemittelten Werte).

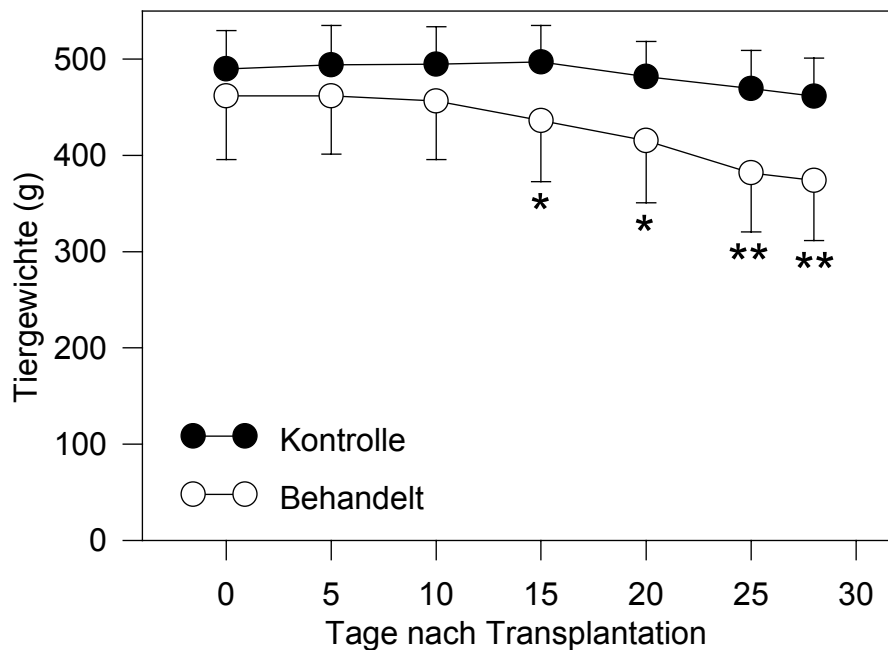
Methode	Tag	Behandelte Gruppe	Kontrollgruppe
<b>Tumorzvolumen sonographisch (mm<sup>3</sup>)</b>	20	1421 $\pm$ 222	1938 $\pm$ 278
<b>Tumorzvolumen Schublehre (mm<sup>3</sup>)</b>	28	6330 $\pm$ 450 *	7701 $\pm$ 426
<b>Tumorgewicht absolut (g)</b>	28	8,01 $\pm$ 0,59	8,89 $\pm$ 0,43
<b>relativ (g/100 g Ratte)</b>	28	4,51 $\pm$ 0,45	3,87 $\pm$ 0,18

### 3.4.3 Gewicht und Trinkmengen der Tiere im Behandlungsversuch

Als weitere Parameter wurden das Verhalten und Aussehen, das Körpergewicht und die Trinkmengen der Versuchstiere überwacht.

Im Verlauf des Versuchs war eine allgemeine Verschlechterung des Zustands der Tiere zu verzeichnen. Es trat eine zunehmende Kachexie auf, die Tiere entwickelten struppiges Fell und in einigen Fällen waren leichte periorbitale Blutungen zu beobachten. Tendenziell traten diese Erscheinungen stärker in der behandelten Gruppe auf. Außerdem konnte stichprobenartig eine Verminderung der Futteraufnahme in dieser Gruppe festgestellt werden.

Entsprechend der erwähnten Kachexie nimmt das durchschnittliche Gewicht der Tiere in beiden Gruppen kontinuierlich ab. Allerdings beginnt dieser Gewichtsverlust in der behandelten Gruppe schon ab dem 10. Tag, während er in der Kontrollgruppe erst am 15. Tag einsetzt und deutlich langsamer verläuft. Ab dem 15. Tag unterscheiden sich die durchschnittlichen Gewichte beider Gruppen statistisch signifikant (siehe Abb. 20 und Tabelle 15).



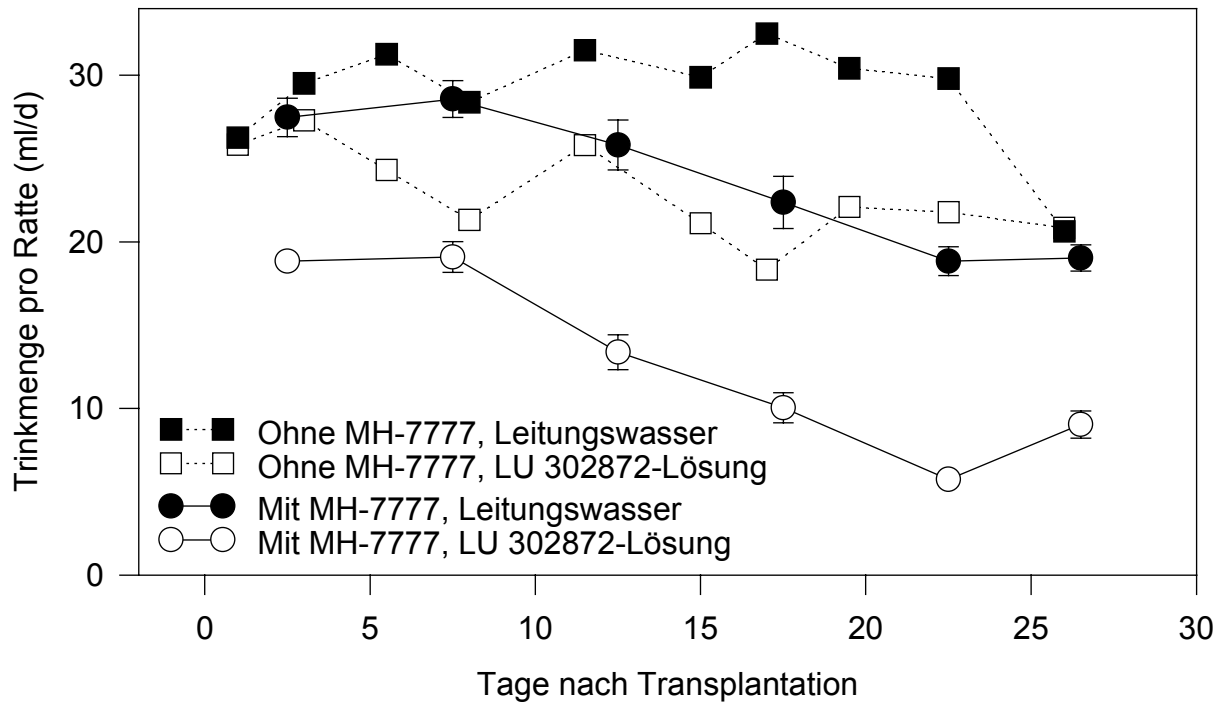
**Abb. 20: Durchschnittliche Tiergewichte im Verlauf des Behandlungsversuchs mit LU 302872 an hepatomtragenden Buffalo-Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.** Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SD) aus jeweils  $n=19$ . \* $p<0,001$ , \*\* $p<0,00001$  vs. Kontrollgruppe am gleichen Tag im unverbundenen t-Test. Der Vergleich beider Kurven in ihrer Gesamtheit ergibt in der ANOVA einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem  $p<0,01$ . Für die in negativer Richtung verlaufende Tendenz der Meßwerte innerhalb einer Gruppe ergibt sich in der ANOVA ein  $p<0,0001$ .

**Tabelle 15: Verschiedene Gewichtsparameter der behandelten und unbehandelten Buffalo-Ratten zu Beginn und am Ende des Behandlungsversuchs.** Die Daten sind Mittelwerte bzw. errechnet aus Mittelwerten aus jeweils  $n=19$  (nur „Gewicht an Tag 1, inklusive später gestorbener Tiere“  $n=22$ ).

Gewichtsparameter	Behandelt	Unbehandelt
Gewicht an <b>Tag 1</b> , inklusive später gestorbener Tiere	467,3 g	486,1 g
Gewicht an <b>Tag 1</b> , exklusive je 3 später gestorbener Tiere	461,6 g	489,7 g
Gewicht an <b>Tag 28</b>	374,1 g	461,5 g
Absoluter Gewichtsverlust von <b>Tag 1 bis Tag 28</b>	87,5 g	28,2 g
Relativer Gewichtsverlust von <b>Tag 1 bis Tag 28</b>	19,0%	5,8%
Gewicht an <b>Tag 1</b> relativ zur jeweils anderen Gruppe	94,3%	106,1%
Gewicht an <b>Tag 28</b> relativ zur jeweils anderen Gruppe	81,1%	123,4%

Schon von Beginn an ist das durchschnittliche Gewicht der behandelten Gruppe ( $461,6 \pm 15,1$  g) niedriger als das der Kontrollgruppe ( $489,7 \pm 9,1$  g), weil die sechs im Verlauf des Versuchs gestorbenen Ratten in der Darstellung in Abb. 20 nicht eingerechnet sind. Da in der behandelten Gruppe schwerere Tiere starben als in der

Kontrollgruppe, verstärkte sich die schon aus der Randomisierung entstandene Tendenz der durchschnittlich schwereren Kontrollgruppe. In der ANOVA zeigt sich beim Vergleich der Gewichtsverläufe beider Gruppen über die gesamte Zeit ein Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,01$ .

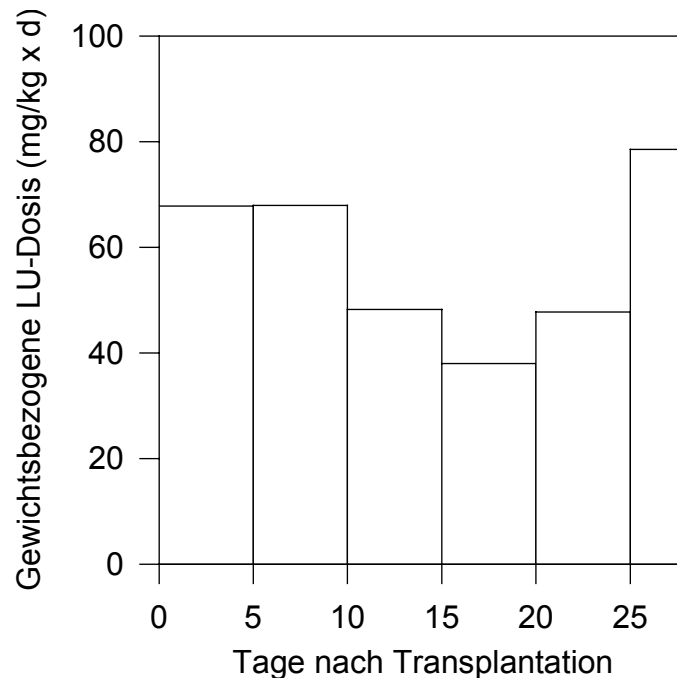


**Abb. 21: Durchschnittliche Trinkmengen der hepatomtragenden Buffalo-Ratten im Behandlungsversuch. Vergleich von LU 302872-behandelten Tieren mit unbehandelten Kontrollen (durchgezogene Linien, runde Symbole).** Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus der durchschnittlichen Flüssigkeitsaufnahme der Tiere aus jeweils sechs Käfigen (à zwei bis vier Tiere). Für alle Meßzeitpunkte gilt  $p < 0,0001$  vs. dem gleichzeitig erhobenen Wert der anderen Gruppe im unverbundenen t-Test. Zum Vergleich (gepunktete Linien, quadratische Symbole) die in Abb. 16 dargestellten durchschnittlichen Trinkmengen von gesunden Buffalo-Ratten, die entweder Leitungswasser, oder eine LU 302872-Lösung bekommen. Diese Daten sind als über alle Tiere gemittelte Werte erhoben worden, daher ist keine Angabe von SE möglich.  $n=4$  für die Kontrollgruppe,  $n=7$  für die LU 302872-Gruppe.

Auch die Trinkmengen beider Gruppen unterscheiden sich von Beginn an signifikant. Schon zwischen dem 1. und 5. Tag beträgt die durchschnittliche Flüssigkeitsaufnahme in der LU 302872-behandelten Gruppe nur 68% der Menge der unbehandelten Kontrollgruppe. Trotz Saccharosezusatz ab dem 20. Tag gehen diese Werte zwischen dem 20. und 25. Tag auf ein Minimum von 30% zurück. Erst in den letzten drei Tagen steigt der Prozentsatz wieder auf 47% der Flüssigkeitsaufnahme der Kontrollgruppe. Damit liegt die unbehandelte Kontrollgruppe im Bereich der Trinkmengen des Vorversuchs mit gesunden Tieren. In den ersten 10 Tagen gleicht die Flüssigkeitsaufnahme der der gesunden Tiere mit Leitungswasserversorgung. Im weiteren Verlauf nähert sich

die Kurve den Trinkmengen der gesunden Tiere mit *LU 302872* im Trinkwasser an. Die Trinkmengen der behandelten hepatomtragenden Ratten liegen weit unter diesem Bereich (*siehe Abb. 21*).

Damit wird die pro Kilogramm Körpergewicht angestrebte *LU 302872*-Dosis von 100 mg/d nicht erreicht. Die tatsächlichen Dosen liegen im Verlauf des Versuchs bei 38,0-78,5 mg/kg×d (*siehe Abb. 22*).



**Abb. 22: Durchschnittlich in der behandelten Gruppe erzielte Dosen von *LU 302872*.** Angaben in mg *LU 302872* pro kg Ratte pro Tag. Die Daten sind Mittelwerte, errechnet aus der durchschnittlichen Flüssigkeitsaufnahme der Tiere aus sechs Käfigen (à zwei bis vier Tiere).

### 3.4.4 Organgewichte nach dem Behandlungsversuch

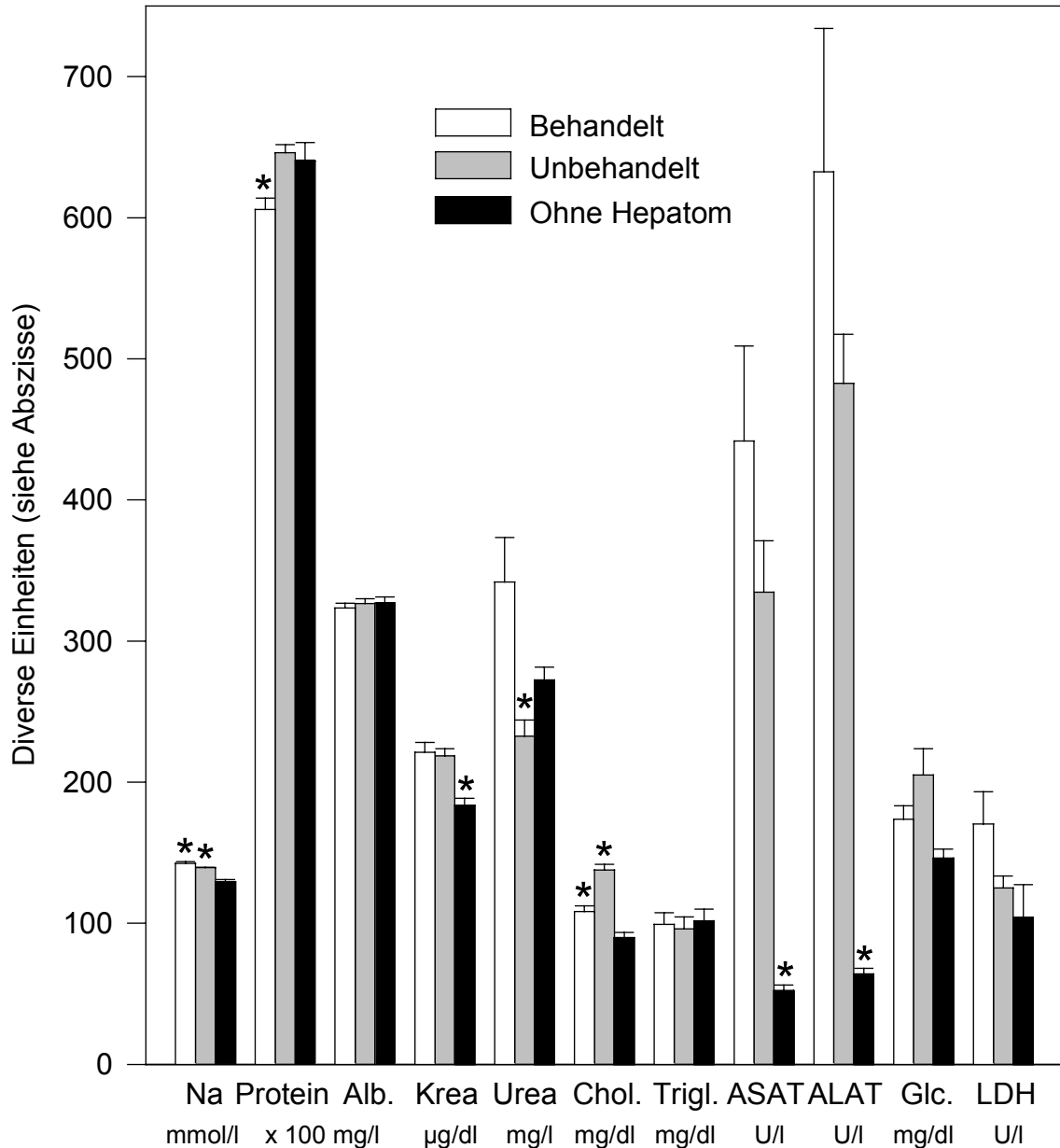
Die durchschnittlichen Gewichte der nach Abschluß des Behandlungsversuchs entnommenen Organe sind in *Tabelle 16* dargestellt. In absoluten Zahlen sind das durchschnittliche Leber-, Nieren- und Herzgewicht in der behandelten Gruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Aufgrund des ebenfalls hochsignifikant niedrigeren durchschnittlichen Körpergewichts in der behandelten Gruppe, gilt dies für die relativen Organgewichte nicht. Hinsichtlich der relativen durchschnittlichen Gewichte von Leber und Herz gibt es keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Das absolute Nierengewicht ist bei den behandelten Tieren signifikant erniedrigt, das relative Nierengewicht dagegen signifikant erhöht.



**Tabelle 16: Durchschnittliche absolute und relative Organgewichte (Leber, Niere, Herz) sowie Körpergewicht der behandelten und unbehandelten Buffalo-Ratten nach Abschluß des Behandlungsversuchs am 28. Tag nach Transplantation.** Die absoluten Gewichtsangaben sind in g, die relativen Gewichtsangaben in g Organ pro 100 g Körpergewicht der einzelnen Tiere. Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus jeweils n=19 (bei Nierengewicht n=38). \*p<0,001, \*\*p<0,00001 vs. Kontrollgruppe im unverbundenen t-Test.

		Behandelt	Kontrolle
<b>Körpergewicht (g)</b>		374 $\pm$ 14,4 **	462 $\pm$ 9,1
<b>Lebergewicht</b>	absolut (g)	12,2 $\pm$ 0,38 *	14,9 $\pm$ 0,55
	relativ (g/100 g)	3,30 $\pm$ 0,09	3,07 $\pm$ 0,20
<b>Nierengewicht</b>	absolut (g)	1,18 $\pm$ 0,03 *	1,34 $\pm$ 0,03
	relativ (g/100 g)	0,32 $\pm$ 0,007 *	0,29 $\pm$ 0,005
<b>Herzgewicht</b>	absolut (g)	1,09 $\pm$ 0,04 *	1,29 $\pm$ 0,04
	relativ (g/100 g)	0,29 $\pm$ 0,007	0,28 $\pm$ 0,007

### 3.5 Serumparameter gesunder und hepatomtragender Buffalo-Ratten



**Abb. 23: Durchschnittliche Konzentrationen der angegebenen Substanzen bzw. Enzymaktivitäten im Serum von behandelten und unbehandelten hepatomtragenden Buffalo-Ratten (♂) sowie altersgleichen gesunden Kontrollen ohne Tumor.** Die Daten sind Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus  $n=16$  in den hepatomtragenden Gruppen sowie  $n=9$  in der gesunden Kontrollgruppe. \* $p<0,05$  vs. den jeweils beiden anderen Gruppen im unverbundenen t-Test. Abkürzungen: Na=Natrium, Alb.=Albumin, Krea=Kreatinin, Chol.=Cholesterin, Trigl.=Triglyceride, ASAT=Aspartataminotransferase, ALAT=Alaninaminotransferase, Glc.=Glukose, LDH=Laktatdehydrogenase.

---

Der deutlichste Unterschied hinsichtlich der Serumwerte von hepatomtragenden und gesunden Tieren zeigt sich bei den Leberenzymen. Die durchschnittlichen Enzymaktivitäten von Aspartataminotransferase und Alaninaminotransferase im Serum sind bei den transplantierten Tieren statistisch signifikant um ein Vielfaches erhöht. Gleiches gilt für die durchschnittlichen Konzentrationen von Natrium, Kreatinin und Cholesterin, wobei hier die Erhöhungen viel schwächer ausgeprägt sind. Außerdem gibt es für Natrium und Cholesterin statistisch signifikante Unterschiede zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe. Im Fall des Natriums mit einem höheren durchschnittlichen Wert in der behandelten Gruppe, beim Cholesterin umgekehrt. Für Albumin, Triglyceride, Glukose und LDH konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Alle anderen Ergebnisse im Detail *siehe Abb. 23*.



## 4 Diskussion

### 4.1 Das Endothelinsystem im *Morris-Hepatom-7777 in vivo*

Das 1988 von YANAGISAWA et al. entdeckte Peptid Endothelin-1 (ET-1) ist nicht nur ein kreislaufwirksames Hormon, sondern besitzt auch wachstumsinduzierende Eigenschaften. *In vitro* wurde vielfach nachgewiesen, daß ET die Proliferation verschiedener neoplastischer Zellen verstärkt und daß dieser Effekt durch ET-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden kann. *In vivo* zeigte sich, daß einige maligne Tumoren ET-1 synthetisieren und peripher erhöhte Plasmakonzentrationen von ET-1 und seinem Vorläufer Big-ET-1 meßbar sind. Jedoch bleibt die tatsächliche Bedeutung des ET-Systems für das Wachstum maligner Zellen und die Angiogenese in Tumoren *in vivo* weiterhin ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das ET-System des experimentellen Lebertumors *Morris-Hepatom (MH)-7777 in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Erstmals wurde versucht, Tumorwachstum auch *in vivo* durch Behandlung mit einem ET-Rezeptorantagonisten zu inhibieren, um Informationen über die Bedeutung des ET-Systems für das Wachstum maligner Tumoren im Wirtsorganismus zu gewinnen.

Zur Charakterisierung des Endothelinsystems im MH-7777 *in vivo*, wurden die (Big-)ET-1-Plasmakonzentrationen von hepatomtragenden Buffalo-Ratten mit denen gesunder Tiere verglichen. Außerdem interessierten die (Big-)ET-1-Gewebekonzentrationen im *Morris-Hepatom* sowie in Lebergewebe von hepatomtragenden und gesunden Ratten. Um eventuellen ET-abhängigen Wachstumsmechanismen näherzukommen, wurde die Dichte der im MH-7777 vorhandenen ET-Rezeptoren und deren Bindungsaffinität bestimmt.

#### 4.1.1 Plasmakonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 bei hepatomtragenden Buffalo-Ratten

Das *Morris-Hepatom-7777* ruft bei den beobachteten Buffalo-Ratten keine Erhöhung der (Big-)ET-1-Plasmakonzentrationen hervor.

Erhöhte Plasma-irET-1-Konzentrationen sind bei einer Vielzahl von Erkrankungen gemessen worden. Insbesondere bei solchen, die mit ischämischem Organversagen bzw. mit sehr schlechten hämodynamischen Zuständen einhergehen (*siehe 1.1.5* und NELSON et al., 1995). Auch bei einigen neoplastischen Erkrankungen konnte diese

Beobachtung gemacht werden. Beispielsweise bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC). Die Angaben der irET-1-Plasmakonzentrationen bei gesunden Kontrollpatienten liegen im Bereich von 1 bis 5 pmol/l, während bei HCC-Patienten signifikant erhöhte Werte in Bereichen von 1,7 bis 90 pmol/l angegeben werden (ISHIBASHI et al., 1993; NAKAMUTA et al., 1993; MATSUMOTO et al., 1994). Auch bei Patienten mit Prostatakarzinom wurden erhöhte irET-1-Plasmakonzentrationen von durchschnittlich 10 pmol/l im Vergleich zu 2 pmol/l bei Kontrollen gemessen (NELSON et al., 1995). Dagegen liegen die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werte von hepatomtragenden Buffalo-Ratten mit  $24,3 (\pm 6,1)$  pmol/l nicht signifikant über den  $24,0 (\pm 3,9)$  pmol/l der gesunden Kontrolltiere.

Zu diesen Befunden ist folgendes anzumerken:

- a) Bei allen HCC-Patienten der oben erwähnten Studien bestand zusätzlich eine Leberzirrhose, auf deren Grundlage sich das Karzinom entwickelt hatte. Eine Leberzirrhose ist schon für sich mit erhöhten irET-1-Plasmakonzentrationen assoziiert. Nur in einer der drei Studien konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Zirrhose und solchen mit zusätzlichem HCC gezeigt werden (NAKAMUTA et al., 1993).
- b) Die fünffach erhöhten irET-Plasmakonzentrationen bei Prostatakarzinom-Patienten gelten nur für weit fortgeschrittene, metastasierte Karzinome, während bei auf das Organ begrenzten Stadien keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollen feststellbar sind (NELSON et al., 1995).
- c) Karzinomzellen produzieren *in vitro* 20-700fach weniger ET-1 als Schweineaorta- oder Kälberpulmonalarterien-Endothelzellen (KUSUHARA et al., 1990). Dies wirft die Frage auf, ob *in vivo* tatsächlich durch Tumorzellen ausreichende Mengen ET-1 produziert werden können, um einen Anstieg der Plasmakonzentration zu bewirken.

Von ISHIBASHI et al. (1993) wurde recht überzeugend durch selektive Messung der arteriovenösen Differenz über das Tumorgefäßbett gezeigt, daß irET-1 aus HCC-Knoten freigesetzt wird. Trotzdem kann vermutet werden, daß bei Karzinompatienten erhöhte periphere ET-1-Konzentrationen Ausdruck eines allgemeinen Krankheitszustands im Sinne einer unspezifischen Wirtsreaktion sind. Diese könnte durch Faktoren ausgelöst werden, die sowohl bei schweren nicht-neoplastischen als auch bei schweren Tumorerkrankungen vorkommen. Beispielsweise könnten bekannte intragenetische Bindungssequenzen für AP-1 und andere Faktoren streßinduzierte ET-1-mRNA-Expression vermitteln (SIMONSON et al., 1990). Insofern wäre die Entwicklung eines

HCC aus einer Leberzirrhose bzw. die Metastasierung eines Prostatakarzinom als graduelle Verschlechterung eines allgemeinen Krankheitsbildes zu verstehen, das zunehmend erhöhte periphere ET-1-Konzentrationen zur Folge hat. Inwieweit die Tumoren durch eigene ET-1-Produktion, die im Vergleich zu Endothelzellen um Größenordnungen geringer ist, zur Erhöhung der Plasmakonzentration beitragen, ist weiter ungeklärt. Als Quelle von erhöhtem peripheren ET-1 bei einigen schweren Erkrankungen wie z.B. Atherosklerose und disseminierter intravasaler Gerinnung werden Endothelschäden vermutet, die zu ET-1-Austritt führen (BATTISTINI et al., 1993a).

All diese Überlegungen haben wenig Relevanz bezüglich der Hypothese der ET-Abhängigkeit von Tumorwachstum und/oder Tumorangiogenese im allgemeinen und bezogen auf das MH-7777 im besonderen, da ET-1 als auto- und parakrin wirkende Substanz gesehen werden kann. Beispielsweise sekretieren Endothelzellen ET-1 abluminal, wo es seine Wirkung auf die darunter liegende glatte Gefäßmuskulatur entfaltet (WAGNER et al., 1992; YOSHIMOTO et al., 1991). Aufgrund der starken Rezeptorbindung des ET-1, spiegeln erhöhte zirkulierende ET-1-Konzentrationen wahrscheinlich bei weitem nicht die viel höheren lokalen ET-1-Konzentrationen wider. Daher ist es kaum möglich, die Plasmakonzentrationen als Ausdruck des lokalen Aktivierungszustands zu interpretieren. Für das in hepatomtragenden Tieren im Plasma ebenfalls nicht relevant erhöhte Big-ET-1 gilt analog das gleiche.

Im Fall des untersuchten MH-7777 besteht also die Möglichkeit, daß entweder die lokal gebildeten ET-1-Mengen definitiv nicht ausreichend für eine Beeinflussung der Plasmakonzentration sind oder daß erst in einem noch späteren Krankheitsstadium eine Plasma-ET-1-Erhöhung eintritt. Dieses wäre entweder durch Produktion seitens des Tumors oder als unspezifische Reaktion des kranken Organismus im Sinne eines Epiphänomens zu erwarten. Es sei als weiterer Gesichtspunkt angemerkt, daß in der Literatur von einem experimentellen Tumor berichtet wird, der - wie wahrscheinlich das MH-7777 - *in vitro* ET-1 produziert, bei dem aber diese ET-1-Produktion *in vivo* immunhistochemisch nicht nachweisbar ist (LOESCH et al., 1997).

#### 4.1.2 Gewebekonzentrationen von irET-1 und irBig-ET-1 bei hepatomtragenden Buffalo-Ratten

Für eine Bedeutung des ET-Systems für das Tumorwachstum des MH-7777 sprechen die deutlich und statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhten Werte von ET-1 und Big-ET-1 im Hepatomgewebe (bezogen auf den Proteingehalt) sowohl gegenüber Lebergewebe von hepatomtragenden Tieren (ET-1 um 115,2% bzw. Big-ET-1 um 40,3% erhöht) als auch von gesunden Kontrollen (ET-1 um 93,7% bzw. Big-ET-1 um 37,0% erhöht). Da die verwendete Nachweismethode keine weitere Lokalisierung der ET-Produktion zulässt, kann über die ET-produzierenden Strukturen im MH-7777 aus den Ergebnissen dieser Arbeit heraus keine Aussage gemacht werden. In Betracht kämen in erster Linie Tumorzellen, Endothelzellen und Fibroblasten. In Lebermetastasen anderer mittel- bis geringgradig differenzierter experimenteller Tumormodelle (Fibrosarkom und Kolonkarzinom) wurde diese Differenzierung mittels elektronenmikroskopischer Immunhistochemie durchgeführt (LOESCH et al., 1997). In normaler Leber der untersuchten Rattenspezies war nur wenig ET-1 in einigen Endothelzellen (in 2% der sinusoidalen und portalvenösen Endothelzellen) und Fibroblasten zu identifizieren. Dagegen waren in den tumorperipher gelegenen Gefäßen der Lebermetastasen je nach Tumortyp 10-20% der Endothelzellen ET-1-positiv. Auch Fibroblasten und einige Tumorzellen des Fibrosarkoms zeigten ET-1-Positivität (LOESCH et al., 1997). Ob diese Verhältnisse im MH-7777 ähnlich sind müsste durch folgende histologische Verfahren geklärt werden.

Interessant ist neben den erhöhten ET-1- und Big-ET-1-Konzentrationen im Hepatomgewebe der Anstieg des Quotienten aus ET-1/Big-ET-1 um 50%. Dies legt zwei Vermutungen nahe, die einzeln oder auch gemeinsam zutreffen könnten. Entweder besteht eine verstärkte ECE-Aktivität, die zu vermehrter Umwandlung des Big-ET-1 zu ET-1 führt; eventuell bei gleichzeitig bestehender Überexpression des PräproET-1-Gens, was die erhöhte Big-ET-1-Konzentrationen erklären könnte. Oder es findet ein verminderter ET-1-Abbau statt, was dann zu einem Anstieg der Konzentrationen von ET-1 und seinen Vorstufen führt.

Über die Regulation des ECE ist bisher relativ wenig bekannt. Es gibt Berichte über eine Inhibition der ECE-Expression durch ET-1 *in vitro* (NAOMI et al., 1998) und *in vivo* (NAKAYAMA et al., 1999). Möglicherweise kommt es im Tumor aufgrund von Hypoxie oder durch lokale Faktoren zu einer Aufhebung dieses Rückkopplungsmechanismus.



Die Folge wären erhöhte ECE-Konzentrationen mit dadurch erhöhtem ET-1/Big-ET-1-Quotienten im Tumorgewebe.

Gesunde weibliche Buffalo-Ratten haben signifikant höhere ET-1- und Big-ET-1-Lebergewebekonzentrationen als gleichaltrige männliche Kontrollen. Im Fall des Big-ET-1 erreicht die durchschnittliche Gewebekonzentration in weiblichen Kontrollebern (Lebern gesunder Tiere) sogar diejenige in Hepatomen aus männlichen Tieren. Auch der ET-1/Big-ET-1 Quotient ist bei den Weibchen signifikant gegenüber den Männchen erhöht. Diese Befunde sprechen für eine hormonelle Beeinflussbarkeit des ET-Systems.

#### 4.1.3 ET-Rezeptoren in Hepatom- und Lebergewebe

Als wesentliches Ergebnis zeigt sich eine Erhöhung der ET<sub>A</sub>-Rezeptordichte um 67% im *Morris-Hepatom-7777* männlicher Tiere im Vergleich zu Kontrolleber ( $p < 0,05$ ), während die ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte geschlechtsunabhängig um 59% verringert ist ( $p < 0,0001$ ).

Auf Leberplasmamembranen gesunder Buffalo-Ratten wurde in der vorliegenden Arbeit eine ET-Rezeptordichte von 152,6 pmol/g Protein für ET<sub>A</sub>-Rezeptoren und 193,3 pmol/g Protein für ET<sub>B</sub>-Rezeptoren gemessen. Diese Werte liegen ungefähr im Bereich der im gleichen Labor mit der gleichen Methode gemessenen Leberplasmamembranen männlicher Wistar-Kyoto-Ratten (HOCHER et al., 1995b).

An Rattenleberplasmamembranen sind geschlechtsabhängige Unterschiede bezüglich des ET-Rezeptorbesatzes bekannt. Bei männlichen Tieren ist eine ausgewogene Verteilung der beiden ET-Rezeptorsubtypen publiziert (SERRADEIL-LE GAL et al., 1991), während weibliche Tiere ein Verhältnis von 80 zu 20 zugunsten des ET<sub>B</sub>-Rezeptors aufweisen (JOUNEAUX et al., 1994). Diese Tendenz ist auch bei den hier untersuchten Buffalo-Ratten nachzuvollziehen. An den Leberplasmamembranen der weiblichen gesunden Tiere ist das ET<sub>B</sub>:ET<sub>A</sub>-Verhältnis 57:43 ( $p < 0,05$  für eine größere ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte im gepaarten t-Test), bei den hepatomtragenden Tieren sogar 69:31 ( $p < 0,01$ ). Demgegenüber beträgt das Verhältnis bei männlichen Tieren in beiden Fällen ca. 53:47 (kein signifikanter Unterschied). In den genannten Studien gehen diese geschlechtsspezifischen Unterschiede mit funktionellen Verschiebungen der Regulation der Glykogenolyse vom ET<sub>A</sub>-Rezeptor bei männlichen zum ET<sub>B</sub>-Rezeptor bei weiblichen Tieren einher. Solche Geschlechtsunterschiede in der Glykogenolyseregulation sind auch für andere Rezeptoren beschrieben (STUDER et al., 1982). Die Vermutung einer sexualhormonabhängigen Expression der ET-Rezeptoren wird durch die vorliegenden Daten unterstützt.

Die Technik der Extraktion einer rohen Membranfraktion läßt keine Differenzierung des globalen ET-Rezeptorbesatzes auf einzelne Strukturen zu. Durch Isolierung der wichtigsten in der Leber vorkommenden Zellarten konnte *in vitro* der ET-Rezeptorbesatz im einzelnen analysiert werden. Das Rezeptormaximum wurde auf den *Ito*-Zellen der Leber festgestellt (HOUSSET et al., 1993). Über den im Verhältnis 80 zu 20 vorherrschenden ET<sub>B</sub>-Rezeptor hemmt ET-1 das Wachstum dieser Zellen (MALLAT et al., 1995). ET<sub>B</sub>-Rezeptoren wurden auch auf Sinusoidalendothel und in Kupffer-Zellen festgestellt (HOUSSET et al., 1993). HOUSSET et al. (1993) konnten in Hepatozyten keine Rezeptor-mRNA nachweisen, während GANDHI et al. (1992) multiple hochaffine ET-Rezeptoren auf Rattenhepatozyten beschreiben.

Während sich die Rezeptorverhältnisse in der Leber gesunder und hepatomtragender Buffalo-Ratten nicht signifikant unterscheiden (auch bei nach Geschlechtern getrennter Betrachtung), sind die Werte für das aus Lebergewebe entstandene Morris-Hepatom 7777 deutlich verändert. In der Gesamtbetrachtung zeigt sich eine im Vergleich zu Kontrolleber auf 126% erhöhte ET<sub>A</sub>-Rezeptordichte ( $p=0,08$ ). Demgegenüber ist die ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte im Vergleich zu Lebergewebe gesunder Tiere auf 41% abgesunken ( $p<0,0001$ ). Es ist hinzuzufügen, daß bei geschlechtsspezifischer Analyse die ET<sub>A</sub>-Rezeptordichtezunahme im MH-7777 ausschließlich bei den männlichen Tieren auftritt (auf 167% [ $p<0,05$ ] gegenüber 98% bei weiblichen Tieren bezogen auf Leber gesunder Tiere).

Zum Verständnis dieser Verschiebung der ET-Rezeptorverhältnisse im MH-7777 bedarf es weiterer Untersuchungen. Ein nächster Schritt wäre beispielsweise die Lokalisation der ET-Rezeptorsubtypen in den verschiedenen Tumorstrukturen durch immunhistochemische Techniken.

Interessant erscheint die Parallele zu Befunden an Prostatakarzinomgewebe, in dem ebenfalls eine deutlich erniedrigte ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte gemessen wurde (NELSON et al., 1996). Sowohl *Scatchard*-Rezeptor-Bindungsstudien und RT-PCR an Prostatakarzinom-Zelllinien als auch Autoradiographien von humanem Prostatakarzinomgewebe zeigten deutlich verminderte bis nicht vorhandene Signale für ET<sub>B</sub>-Rezeptoren bzw. deren mRNA (NELSON et al., 1996).

Sowohl beim Prostatakarzinom als auch beim MH-7777 könnte die verminderte ET<sub>B</sub>-Rezeptorexpression Faktoren wie Sekretion, Funktion und Elimination des ET-1 beeinflussen. So verläuft beispielsweise die Elimination zumindest des zirkulierenden Endothelins bei Ratten über ET<sub>B</sub>-Rezeptoren. Die Bindung von [<sup>125</sup>I]ET-1 *in vivo* wird

durch einen ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten inhibiert und die Infusion eines ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten führt zu signifikant erhöhten ET-1-Plasmakonzentrationen (FUKURODA et al., 1994). Ein ähnliches hormonales „Puffersystem“ ist für silente ANP-Rezeptoren vorgeschlagen worden (MAACK et al., 1987). Auch ein bestehendes ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermitteltes autokrines *Feedback*-System könnte beeinflusst werden (WARNER et al., 1993). Von humanen Keratinozyten ist bekannt, daß sie ausschließlich ET<sub>B</sub>-Rezeptoren besitzen und durch exogenes ET-1 in ihrer ET-1-Sekretion gehemmt werden (YOHN et al., 1994). Diese Befunde wären durch die beschriebene ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelte Hemmung des ECE und dadurch verminderte ET-1-Synthese zu erklären (NAOMI et al., 1998). Im MH-7777 könnte in diesem Sinne durch die verminderte ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte eine verstärkte ECE-Aktivität bestehen, die den erhöhten ET-1/Big-ET-1-Quotienten erklären würde. Alle genannten Hypothesen werden durch den Befund der im Hepatomegewebe erhöhten ET-1- und Big-ET-1-Konzentrationen unterstützt.

Die verminderten ET<sub>B</sub>-Rezeptoren könnten sowohl über die veränderte ET-Regulation als auch über andere Mechanismen die Tumorprogression des Hepatoms unterstützen. Der vasodilatatorische Effekt der ET-Isopeptide ist mit ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelter NO-Produktion in Verbindung gebracht worden, welche ihrerseits ET<sub>A</sub>-Rezeptor-induzierter Vasokonstriktion entgegenwirkt (WARNER et al., 1989; HIRATA et al., 1993). NO reguliert allerdings nicht nur den ET-1-abhängigen Gefäßtonus, sondern greift auf verschiedenen Ebenen an, um als ET-1-Gegenspieler zu wirken. ET-Rezeptorbindung, daraus folgender Kalziumanstieg und endotheliale ET-1-Sekretion werden durch NO antagonisiert (GOLIGORSKI et al., 1994; BOULANGER et al., 1990). Obwohl die genaue Rolle des NO für das Tumorwachstum weiterhin unbekannt ist, gibt es einige Hinweise auf wachstumshemmende Wirkungen. NO induziert Zytotoxizität (CORASANITI et al., 1994) und Apoptose (KITASJIMA et al., 1994; FUKO et al., 1996) *in vitro*, während *in vivo* sowohl Hemmung von Metastasenwachstum als auch Tumorwachstumsförderung beschrieben wird (XIE et al., 1995; JENKINS et al., 1995). Ähnliche Phänomene wären im *Morris*-Hepatom aufgrund mangelnder ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelter NO-Synthese denkbar. Um weitere Klarheit über die Funktion des ET<sub>B</sub>-Rezeptors bei Lebertumoren zu bekommen, wäre eine Rezeptorstudie an humanem HCC-Gewebe oder anderen Leberneoplasien interessant.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im Fall des MH-7777 bis zum 21. Tag nach Tumortransplantation kein erhöhtes Plasma-ET-1 feststellbar ist. Es ist nicht abschließend geklärt, ob die bei anderen Tumoren gemessenen erhöhten ET-1-Konzentrationen ursächlich durch die Eigenproduktion des jeweiligen Tumors hervorgerufen werden. Eine Interpretation als unspezifisches Epiphänomen erscheint möglich. Für die Frage der lokalen proliferativen Bedeutung des Endothelins ist dies wenig relevant, da es sich bei ET-1 um ein vorwiegend auto- und parakrin wirkendes Hormon handelt. Für eine Bedeutung des ET-Systems im MH-7777 sprechen erhöhte (Big-)ET-1-Gewebekonzentrationen und ein erhöhter ET-1/Big-ET-1-Quotient in Hepatomgewebe. Letzterer wäre entweder durch eine verstärkte ECE-Aktivität oder einen verminderten ET-1-Abbau (möglicherweise aufgrund der verminderten ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte) zu erklären. Die ET<sub>A</sub>-Rezeptordichte im *Morris*-Hepatom ist im Vergleich zu Kontrolleber nur bei den männlichen Tieren (auf 167%) erhöht (bei den weiblichen Tieren gibt es keine Differenz), während die ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte geschlechtsunabhängig (wie beim Prostatakarzinom) stark verringert ist. Für die Klärung der Bedeutung dieses Phänomens bedarf es weiterer Untersuchungen. Vorstellbare Wirkungen sind eine geringere ET<sub>B</sub>-vermittelte ET-1-Elimination, eine verstärkte ECE-Aktivität durch Verminderung der ET<sub>B</sub>-vermittelten Hemmung sowie eine Reduktion der ebenfalls ET<sub>B</sub>-vermittelten Produktion von NO, welches wachstumshemmende Eigenschaften besitzen kann.

## 4.2 Bedeutung des ET-Systems für das Wachstum von MH-7777-Zellen *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Menge des endogen synthetisierten irET-1 im Überstand kultivierter *Morris-Hepatom* (MH)-7777-Zellen bestimmt. Außerdem wurden MH-7777-Zellen *in vitro* mit ET-1 stimuliert sowie unabhängig davon mit verschiedenen ET-Rezeptorantagonisten behandelt, um die Bedeutung des ET-Systems für das Wachstum dieser Tumorzelllinie zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, daß Medien von *in vitro* kultivierten MH-7777-Zellen nach 24stündiger Inkubation im ET-1-ELISA klar nachweisbare Mengen an immunreaktivem (ir) ET-1 enthalten, während dies in Kontrollmedium ohne Zellen nicht der Fall ist. Die Behandlung mit ET-Rezeptorantagonisten ergibt eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung, die bei der höchsten verwendeten Konzentration des ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten LU 302872 in beiden durchgeführten Proliferationsassays ca. 50% beträgt ( $p < 0,05$ ).

Die von den MH-7777-Zellen gebildeten irET-1-Mengen liegen bei durchschnittlich  $10,3 \text{ fmol}/10^6$  Zellen in 24 Stunden. Dieses entspricht einer nach 24 Stunden erreichten irET-1-Konzentration von ca.  $10^{-11} \text{ mol/l}$  Medium.

Die Menge des endogen gebildeten ET-1 befindet sich damit im Bereich der Literaturangaben für andere Tumorzelllinien. Diese liegen beispielsweise für HeLa- und Hep-2-Zellen unter (wie in der vorliegenden Arbeit) FCS-freien Bedingungen bei 3,5 bzw.  $22,3 \text{ fmol}/10^6$  Zellen in 24 Stunden (SHICHIRI et al., 1991b). MORAITIS et al. (1997) geben für zwei Linien von Ovarialkarzinomzellen gebildete ET-1-Mengen von 1,7 bzw.  $20,2 \text{ fmol}/10^6$  Zellen in 72 Stunden an, während KUSUHARA et al. (1990) über irET-1-Konzentrationen von  $0,42\text{--}15 \times 10^{-11} \text{ mol/l}$  in verbrauchten Medien von 13 humanen Krebszelllinien berichten.

Diese durch endogene Produktion erzielten ET-1-Konzentrationen sind ausreichend, um mitogene Effekte zu erzielen. Von mehreren Autoren wird eine erfolgreiche exogene Stimulation von Tumorzellen *in vitro* im Konzentrationsbereich von  $10^{-11}$  bis  $10^{-7} \text{ mol/l}$  beschrieben (SHICHIRI et al., 1991a,b; PAGOTTO et al., 1995; NELSON et al., 1995; MORAITIS et al., 1997). Es gibt sogar Berichte über proliferative Wirkungen bei noch geringeren ET-1-Konzentrationen. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen stellen sich in den erwähnten Publikationen sehr unterschiedlich dar. In einigen steigt die mitogene Wirkung linear an, in anderen gibt es Maxima an bestimmten

Konzentrationsstufen, nach denen die Wirkung mit steigender Konzentration wieder abnimmt (z.B. MORAITIS et al., 1997).

Die exogene ET-1-Stimulation der *Morris*-Hepatom-7777-Zellen wurde mit Konzentrationen von  $10^{-11}$  bis  $10^{-5}$  mol/l durchgeführt. Sie bewirkte im Konzentrationsbereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  mol/l eine im *MTT*-Proliferationsassay gemessene statistisch signifikante Proliferationssteigerung ( $p < 0,05$ ). Es gibt eine grobe Übereinstimmung zwischen dem Kurvenverlauf der Durchschnittswerte aus dem *MTT*-Assay und den Werten des wahrscheinlich zuverlässigeren *BrdU*-Assays (siehe Abb. 12, zu den möglichen Ursachen unterschiedlicher Resultate beider verwendeter Proliferationsassays siehe unten). Eine direkte Zählung der Zellen, z.B. mittels eines Durchflußzytometers, erwies sich aufgrund der nicht vollständigen Vereinzelbarkeit der Zellen als undurchführbar.

Ein weiterer Anhaltspunkt für eine tatsächlich bestehende proliferative Wirkung des ET-1 auf die MH-7777-Zellen sind die mikroskopischen Beobachtungen im Rahmen der Trypanblau-Färbung. Die ET-1-stimulierten Zellen erschienen in allen Konzentrationsstufen optisch eindeutig weniger bläulich angefärbt und vitaler. Es waren fast keine angefärbten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu sehen. Der durchschnittliche Wert auf der semiquantitativen optischen Quantifizierungsskala für bläulich angefärbte Zellen von 0 bis 5 lag bei 0,54 im Vergleich zu den durchschnittlichen Werten der Kontrollen und den mit ET-Rezeptorantagonisten stimulierten Zellen aller Konzentrationen im Bereich zwischen 1,42 und 1,75. Unter Mangelbedingungen kultivierte Zellen mit Austausch des Mediums durch nährstofffreien PBS erreichten Werte von 3,33, d.h. die Mehrzahl der Zellen war in diesem Fall bläulich angefärbt und damit geschädigt.

Nach diesem semiquantitativen Verfahren zu urteilen, ist der Zustand der ET-1-stimulierten MH-7777-Zellen deutlich besser als der der Kontrollen, was sich im Vergleich zu den Kontrollen in optisch eindeutig geringerer Anfärbbarkeit der Zellen durch den Farbstoff Trypanblau äußert. Dieser wird lediglich von irreversibel geschädigten Zellen aufgenommen. Die Feststellung gilt für alle Konzentrationsstufen ohne erkennbaren Unterschied.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß MH-7777-Zellen unter FCS-freien Bedingungen eine Substanz produzieren, die sich als irET-1 nachweisen läßt. Die Menge dieses produzierten irET-1 liegt in der Größenordnung der ET-1-Produktion anderer Tumorzellen. Die Konzentration des irET-1 liegt in dem Bereich, für den *in vitro*

mitogene Effekte gezeigt werden konnten. Exogene Stimulation der MH-7777-Zellen mit diesen und höheren Konzentrationen führte zu Ergebnissen, die innerhalb eines großen Schwankungsbereichs eine proliferationssteigernde Wirkung des ET-1 erkennen lassen (für  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  mol/l ET-1 im *MTT*-Proliferationsassay  $p < 0,05$ ). Diese wird durch mikroskopische Beobachtungen nach Trypanblau-Färbung bestätigt, in denen ET-1-stimulierte MH-7777-Zellen deutlich weniger anfärbbar sind und einen vitaleren Eindruck machen als die entsprechenden Kontrollen. Unter Annahme dieser Ergebnisse kann ein autokriner Mechanismus der ET-1-vermittelten Proliferation für die untersuchten MH-7777-Zellen vermutet werden. Ein solcher Mechanismus wurde schon für andere Zellen, wie z.B. humane Tumorzellen (SHICHIRI et al., 1991b) und Endothelzellen (EGUCHI et al., 1995) nachgewiesen (*siehe auch 1.1.5*).

Nach der Quantifizierung sowie exogenen Verstärkung des endogenen ET-Systems folgte die Hemmung der Wirkung des von den Tumorzellen endogen produzierten ET. Dabei ist zu beachten, daß exogen zugegebene ET-Rezeptorantagonisten zur Entfaltung ihrer Wirkung zunächst das relativ fest an den Rezeptoren gebundene endogene ET aus seiner Bindung verdrängen müssen.

Die Art der an der ET-1-vermittelten Proliferation beteiligten Rezeptoren wurde durch den Einsatz von ET-Rezeptorantagonisten näher untersucht. Sowohl die selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten *BQ 123* und *LU 135252* als auch der kombinierte ET<sub>A/B</sub>-Rezeptorantagonist *LU 302872* führten nach 24stündiger Inkubation mit nicht exogen stimulierten Hepatomzellen zu einer verminderten *MTT*-Reduktion. Das Ausmaß der *MTT*-Reduktion wird im *MTT*-Proliferationsassay als Ausdruck der Zellzahl angesehen. Dies gilt in gleicher Weise für den Einbau von *BrdU* im *BrdU*-Proliferationsassay. Die im *BrdU*-Assay gemessene Extinktion als Maß für den *BrdU*-Einbau bestätigt die Ergebnisse des *MTT*-Assays nur bedingt. Ein weitgehend übereinstimmender Kurvenverlauf über die verschiedenen Konzentrationsstufen findet sich lediglich für den kombinierten ET<sub>A/B</sub>-Rezeptorantagonisten *LU 302872*. Bei den ET<sub>A</sub>-selektiven Rezeptoren steht den Ergebnissen einer über 50%igen Hemmung der *MTT*-Reduktion bei der jeweils höchsten Antagonistenkonzentration eine lediglich bei der höchsten Konzentration erkennbare leichte, aber statistisch signifikante Verminderung des *BrdU*-Einbaus gegenüber.

Die beste Methode zur Erfassung von Zellproliferation ist die direkte Zellzählung in einer Zählkammer oder mittels eines Durchflußzytometers. Entsprechende Versuche schlugen aufgrund der mangelnden Vereinzelbarkeit der Zellen fehl. Daher wurden zwei

auf verschiedenen Prinzipien basierende Proliferationsassays parallel durchgeführt. Der kolorimetrische *MTT*-Assay ist ein verbreitetes Verfahren zur Messung der Zahl lebender Zellen in Zellkultursystemen. Er beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes *MTT* durch verschiedene intrazelluläre Enzyme. Dies geschieht unter Bildung eines Formazan-Farbstoffs. Der *BrdU*-Assay mißt im Gegensatz zum *MTT*-Assay nicht die Stoffwechselaktivität der vorhandenen Zellen, sondern deren DNA-Synthese als direkteren Ausdruck der proliferativen Aktivität. Die Methode wurde als Alternative zum „Goldstandard“ der Proliferationsassays, dem [ $^3\text{H}$ ]Thymidin-Assay entwickelt. Wie dieser beruht auch der *BrdU*-Assay auf dem Einbau eines markierten Nukleotids, das über nachgeschaltete Reaktionen quantifizierbar gemacht wird. Diese unterschiedlichen Funktionsmechanismen machen divergierende Resultate vorstellbar.

Bei einem einschätzenden Vergleich beider Methoden zur Bestimmung der relativen Zellzahl stößt man für den *MTT*-Assay auf zahlreiche beschriebene Einschränkungen der Zuverlässigkeit. Es werden falsch positive Resultate (ROLLINO et al., 1995) sowie zu hohe Ergebnisse bezüglich der Zellzahlen bei hohen FCS-Konzentrationen beschrieben (ZHANG et al., 1996). Es erscheint möglich, daß durch verschiedene Faktoren, wie z.B. FCS, Enzyme so moduliert werden, daß dies zu einer verstärkten *MTT*-Reduktion führt. Auch das umgekehrte Phänomen einer verminderten *MTT*-Reduktion beispielsweise durch den *PKC*-Inhibitor *Calphostin C* ist bekannt (BERRIDGE et al., 1992). Die *MTT*-Reduktion beteiligt verschiedene Enzyme in unterschiedlichen Zellkompartimenten unter Verwendung reduzierter Pyridinnukleotide als Kofaktoren. Die lange vorherrschende Vorstellung einer vorwiegend succinatabhängigen mitochondrialen *MTT*-Reduktion durch die Succinatdehydrogenase wurde zugunsten der einer vorwiegend *NAD(P)H*-abhängigen mikrosomalen Reduktion korrigiert (BERRIDGE et al., 1993; BERRIDGE et al., 1997). Die zelluläre Produktion reduzierter Pyridinnukleotide, insbesondere von *NADH*, scheint der limitierende Faktor der *MTT*-Reduktion zu sein. Damit wäre die *MTT*-Reduktion in erster Linie ein Maß der glykolytischen *NADH*-Produktion (BERRIDGE et al., 1997).

So, wie der *PKC*-Antagonist *Calphostin C* (*PKC*- und *NAD(P)H*-unabhängig) den unbedeutenderen Teil der mitochondrialen *MTT*-Reduktion hemmt (BERRIDGE et al., 1992), wäre es vorstellbar, daß  $\text{ET}_\text{A}$ -Rezeptorantagonisten ebenfalls Enzyme inhibieren, die zur *MTT*-Reduktion notwendig sind. In den vorliegenden Experimenten liegt eine Verringerung der *MTT*-Reduktion von über 50% vor. Daher ist eine Hemmung der *NAD(P)H*-Produktion oder des mikrosomalen Reduktionsvorgangs (als wesentlichste



Faktoren der *MTT*-Reduktion) durch die  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten als am wahrscheinlichsten anzunehmen, wenn man davon ausgeht, daß es sich beim *BrdU*-Proliferationsassay um die verlässlichere Methode handelt. In jedem Fall ist bei der höchsten Konzentrationsstufe der  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten eine Proliferationshemmung zu verzeichnen. Auch wenn sie im *BrdU*-Assay für  $10^{-4}$  mol/l *LU 135252* nur bei 88,8% ( $p < 0,05$ ) und für  $5 \times 10^{-3}$  mol/l *BQ 123* bei 82,6% ( $p < 0,05$ ) der unbehandelten Kontrollen liegt (statt bei 33,5% bzw. 43,6% der Kontrollen im *MTT*-Assay).

Es kann also (bei Annahme der diskutierten Voraussetzungen) durch den kombinierten  $ET_{A/B}$ -Rezeptorantagonisten *LU 302872* eine deutlich stärkere Proliferationshemmung erreicht werden (auf ca. 50% der Kontrollen) als durch die beiden selektiven  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten (88,8% bzw. 82,6% der Kontrollen). Dies läßt vermuten, daß die proliferative Wirkung des ET-1 an MH-7777-Zellen vorwiegend über  $ET_B$ -Rezeptoren vermittelt wird. Allerdings ist auch durch die selektive Blockung der  $ET_A$ -Rezeptoren eine Proliferationshemmung von mindestens 11% zu erzielen. Daher könnte es sich bei der Wachstumshemmung durch kombinierte Antagonisierung beider ET-Rezeptoren um einen synergistischen Effekt handeln. Dies würde bedeuten, daß die Behandlung mit einem spezifischen  $ET_B$ -Rezeptorblocker unter Umständen ebenfalls nur zu einer leichten Proliferationshemmung führt und lediglich die Kombination aus  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptorblock die beobachteten drastischen Effekten bewirkt.

Nach dem bisherigen Stand der Forschung können keine verlässlichen allgemeinen Aussagen darüber gemacht werden, welche ET-Rezeptoren vorwiegend an der Auslösung ET-1-abhängiger mitogener Effekte beteiligt sind (ŠEDO et al., 1996). Es existieren eine Reihe von in der Einleitung erwähnten Untersuchungen (siehe 1.1.8), die eine Hemmung von ET-1-induzierten mitogenen Effekten durch den  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten *BQ 123* beschreiben. Allerdings wurden auch  $ET_B$ -Rezeptor-vermittelte Proliferationsseffekte an Endothelzellen (ZICHE et al., 1995) und humanen primären und metastatischen Melanomzellen (KIKUCHI et al., 1996) nachgewiesen. Daneben gibt es einen Bericht über  $ET_B$ -Rezeptor-vermittelte Wachstumshemmung von humanen myofibroblastischen *Ito*-Zellen durch ET-1 (MALLAT et al., 1995). Diese Ergebnisse sprechen für eine Wachstumsstimulierung sowohl über den  $ET_A$ - als auch über den  $ET_B$ -Rezeptor, je nach untersuchter Zellart. Es ist allerdings anzumerken, daß es nicht genügend systematische Untersuchungen zu den unterschiedlichen Wirkungen der verschiedenen ET-Rezeptoren mit eventuell zu beobachtenden synergistischen Effekten auf proliferative Vorgänge gibt. Die Wachstumshemmung durch ET-1 stellt wahrscheinlich einen

isolierten Sonderfall dar. Bei der Hemmung ET-1-induzierter mitogener Effekte durch den ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten *BQ 123* handelt es sich fast ausschließlich um Reduzierung von Proliferation, die durch exogenes ET-1 induziert wurde. Lediglich MORAITIS et al. (1997) führten eine erfolgreiche Hemmung nicht exogen stimulierter Tumorzellen mit *BQ 123* durch. Auffallend sind die mindestens 1000fach geringeren *BQ 123*-Konzentrationen, die zur Wachstumshemmung benötigt werden. PAGOTTO et al. (1995) hemmen ET-1-stimulierte Meningeomzellen mit *BQ 123* in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l. MORAITIS et al. (1997) benötigen lediglich  $10^{-7}$  mol/l *BQ 123*, um sowohl ET-1-stimulierte als auch nicht stimulierte Ovarialkarzinomzellen in ihrem Wachstum zu hemmen. Dagegen traten in der vorliegenden Arbeit statistisch signifikante Effekte erst ab *BQ 123*-Konzentrationen von  $10^{-3}$  mol/l auf.

Dies legt die Vermutung nahe, es könne sich bei den beobachteten wachstumshemmenden Effekten um toxische Wirkungen der hochdosierten ET-Rezeptorantagonisten handeln. Die Auswertung der LDH-Konzentrationen im Überstand der behandelten Zellen spricht gegen diese Vermutung. Alle durchschnittlichen LDH-Werte in den Kulturüberständen der mit der höchsten verwendeten ET-Rezeptorantagonisten-Konzentration inkubierten MH-7777-Zellen liegen dicht bei den durchschnittlichen Werten unbeeinflusster Kontrollen (92-122% der Kontrollwerte). Tatsächlich schädigende Bedingungen wie Austausch des Mediums durch PBS oder Inkubation mit 20% *DMSO* führten zu einer drastischen Steigerung der durchschnittlichen LDH-Konzentrationen auf fast das doppelte bzw. mehr als das dreifache der Kontrollkonzentrationen. Auch die Anfärbung der Zellen mit Trypanblau erbrachte keinen Hinweis auf toxische Effekte. Diese würden sich in verstärkter Anfärbbarkeit der toxisch geschädigten Zellen mit dem verwendeten Farbstoff äußern. In der semiquantitativen optischen Quantifizierungsskala für bläulich angefärbte Zellen von 0 bis 5 erreichte keine der mit ET-Rezeptorantagonisten behandelten Kulturen Werte über den 1,75 der Kontrollen.

Ein weiterer Gesichtspunkt zur Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist die Rolle apoptotischer Prozesse. Als Gegenpol zu proliferativen Vorgängen ist häufig Apoptose zu beobachten. In diesem Zusammenhang wurde ET-1 als protektiver, Apoptose inhibierender Faktor beschrieben (WU-WONG et al., 1997; SHICHIRI et al., 1997; SHICHIRI et al., 1998). Die Tatsache, daß bei der Trypanblau-Färbung der ET-1-behandelten Zellen fast keine bläulich angefärbten Zellen zu sehen sind (ein sehr geringer Wert von 0,54 auf der semiquantitativen optischen Quantifizierungsskala), könnte möglicherweise mit einer Hemmung der auch bei den Kontrollen in gewissem

Umfang natürlich stattfindenden Apoptose erklärt werden. Möglicherweise greifen auch die ET-Rezeptorantagonisten in die Regulation der Apoptose ein. Da in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zum Nachweis apoptotischer Zellen durchgeführt wurden, sind diese Überlegungen lediglich als Ausblick auf mögliche weiterführende Forschungsvorhaben zu verstehen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der Beurteilung der Proliferation der mit ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten inkubierten MH-7777-Zellen Diskrepanzen zwischen den beiden parallel durchgeführten Proliferationsassays auftraten. Diese sind möglicherweise dadurch zu erklären, daß es durch die isolierte Blockierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors zu einer Beeinflussung der für die *MTT*-Reduktion wesentlichen Enzyme bzw. Kofaktoren kommt. Nach Auswertung des wahrscheinlich verlässlicheren *BrdU*-Assays zeigt sich eine knapp 50%ige Proliferationshemmung durch Inkubation der MH-7777-Zellen mit hohen Konzentrationen des kombinierten ET<sub>A/B</sub>-Rezeptorantagonisten *LU 302872*. Dagegen liegt die Hemmung durch die ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten *LU 135252* und *BQ 123* jeweils nur im Bereich von 10%-20%. Es kann also ein vorwiegend ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelter oder auch ein synergistisch über beide Rezeptoren wirkender ET-abhängiger proliferativer Mechanismus vermutet werden. Die Tatsache, daß höhere als für andere Zellen in der Literatur beschriebene Konzentrationen an ET-Rezeptorantagonisten zur Proliferationshemmung benötigt wurden legt die Vermutung toxischer Effekte nahe. Diese konnte jedoch durch Bestimmung der LDH-Konzentrationen im Kulturüberstand und Trypanblau-Färbung nicht bestätigt werden. Ob Apoptoseprozesse für die beobachteten Phänomene von Bedeutung sind muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### 4.3 Wachstumshemmung des MH-7777 durch LU 302872 *in vivo*

#### 4.3.1 Vorbemerkung

Wegen der *in vitro* am deutlichsten ausgeprägten proliferationshemmenden Wirkung wurde auch zum Versuch der Tumorbehandlung *in vivo* ein kombinierter ET<sub>A/B</sub>-Rezeptorantagonist eingesetzt. Aus einer isolierten Blockung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors scheint nur eine geringere Wachstumshemmung zu folgen. Ob der Effekt des LU 302872 auf die Zellen also vorwiegend über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor vermittelt wird, als gemeinsame Wirkung aus der Inhibierung beider Rezeptoren hervorgeht oder auf einem unbekannten Mechanismus dieser relativ neuen Substanz beruht, ist nicht bekannt. Der Versuch einer Reproduktion des hemmenden Effekts auf das MH-7777 *in vivo* liegt dem Experiment hypothetisch zugrunde.

Für den Behandlungsversuch des Hepatoms *in vivo* gibt es allerdings noch andere Gesichtspunkte, da hier nicht nur die direkte Beeinflussung der Hepatomzellen, sondern auch die Wirkung auf Fibroblasten, Endothel- und Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Tumorangio-genese von Bedeutung ist. Für glatte Gefäßmuskelzellen sind ET<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte mitogene Wirkungen von ET-1 bekannt (EGUCHI et al., 1992a; OHLSTEIN et al., 1992; GUO et al., 1996; *siehe* 1.1.8), so daß in diesem Zusammenhang auch ein Block des ET<sub>A</sub>-Rezeptors relevant sein könnte. Für Endothelzellen wurde eine Stimulierung von Zellwachstum und Proliferation über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor beschrieben (ZICHE et al., 1995). Die ET-Produktion dafür erfolgt zum Teil autokrin (EGUCHI et al., 1995). In Lungentumoren sind ET-Bindungsstellen in Blutgefäßen nachgewiesen (ZHAO et al., 1995). Bei kolorektalen Karzinomen werden ET-Bindungsstellen hauptsächlich in Tumorgefäßen und im Stroma um neoplastische Zellnester beschrieben (INAGAKI et al., 1992). Um die in dieser Arbeit nur global im Hepatom gemessenen Rezeptordichten Tumor-, Bindegewebs- und Muskelzellen zuordnen zu können, müßten Rezeptorstudien an den Tumorzellkulturen bzw. immunhistochemische Untersuchungen an Hepatome-gewebe durchgeführt werden. Die genannten Daten lassen jedoch eine Rolle des ET-1 für vaskuläre Regulationsprozesse im Tumorgefäßbett vermuten.

Ein weiterer Unterschied der Verhältnisse *in vivo* gegenüber der Zellkultur ist zu berücksichtigen. Die überadditiven gegenseitigen Verstärkungen von ET-1 und vielen anderen Wachstumsfaktoren (BATTISTINI et al., 1993b) legen die Vermutung nahe, daß ET-1 möglicherweise eine eher regulierende als rein mitogene Wirkung ausübt. Dieser

Aspekt ist *in vivo* von noch größerer Bedeutung, da mehr zusätzliche Wachstumsfaktoren an der Tumorentwicklung beteiligt sind als in FCS-freiem Medium in der Zellkultur. So wurde beispielsweise gezeigt, daß die Wirkung von TGF $\beta$  je nach zusätzlich vorhandenen Wachstumsfaktoren sowohl proliferationssteigernd als auch antiproliferativ sein kann (ROBERTS et al., 1985).

Trotz fehlender detaillierter Kenntnis der ET-bezogenen molekularen Vorgänge im MH-7777 und ohne den Anspruch, diese durch den Versuch aufklären zu wollen, wurden 22 männliche Buffalo-Ratten über 28 Tage mit *LU 302872* behandelt. Ziel war die Beantwortung der Frage, ob das ET-System für das Hepatomwachstum *in vivo* eine Rolle spielt und ob Versuche einer Beeinflussung von Tumorwachstum *in vivo* durch Eingriffe in das ET-System erfolgversprechend erscheinen.

#### **4.3.2 Wachstumsverhalten des MH-7777 bei Behandlung mit *LU 302872***

Die beidseits in die Oberschenkelmuskulatur der Ratten transplantierten Hepatome wachen langsamer in den Tieren, die *LU 302872* mit dem Trinkwasser aufnehmen. Der zwischen rechtem und linkem Hepatom gemittelte transversale Durchmesser ist ab dem 15. Tag nach Transplantation im Verlauf an allen Meßpunkten um 9-21% geringer als bei Kontrollen (Unterschiede an Tag 15, 25 und 28 signifikant). Auch das sonographisch ermittelte Tumolvolumen, das Entnahmegewicht und das errechnete Entnahmevolumen der Hepatome sind in der behandelten Gruppe geringer (letzteres statistisch signifikant).

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise *LU 302872* das geringere absolute Wachstum der Hepatome bewirkt. Einerseits könnte dies über die Hemmung der Tumorzellproliferation analog den Zellkulturexperimenten geschehen (*siehe 4.2*). Alternativ oder auch zusätzlich wäre eine Hemmung der Tumorangiogenese denkbar, welche ihrerseits zu Minderversorgung des Hepatomgewebes und einer daraus resultierenden Wachstumsverlangsamung führt. Auch die mögliche Rolle von Apoptoseprozessen bei der Tumorwachstumshemmung muß im Rahmen der beschriebenen Rezeptorveränderungen im MH-7777 bedacht werden (die ET<sub>A</sub>-Rezeptordichte ist gegenüber Lebergewebe erhöht, die ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte vermindert, *siehe 4.1.3*)

Schon erwähnt wurde die in Mastozytom- und Gefäßmuskelzellen bekannte ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelte NO-abhängige (über cGMP und *Fas*) Apoptose (KITASJIMA et al., 1994; FUKO et al., 1996), welche eine Apoptoseverminderung bei geringerer

ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte erklären könnte. Auch über die verstärkte ET<sub>A</sub>-Rezeptorexpression im MH-7777 kann Apoptose unterdrückt werden. An Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten mit dereguliertem *c-myc* sind ET-1-abhängige apoptoseprotektive Wirkungen bekannt (WU-WONG et al., 1997; SHICHIRI et al., 1997; SHICHIRI et al., 1998). Diese werden möglicherweise durch Anwendung von ET-Rezeptorantagonisten wie im durchgeführten Versuch abgeschwächt und führen dadurch zu geringerem Wachstum. Allerdings konnte an Prostatakarzinomzellen kein apoptoseprotektiver Effekt durch ET-1 erzielt werden. NELSON et al. (1996) vermuten eher einen mitosesteigernden als einen apoptosesenkenden Effekt durch ET-1. Zur Klärung dieser Fragen in bezug auf das MH-7777 müßten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Der Gewichtsverlauf in der unbehandelten Gruppe liegt im in der Literatur beschriebenen Bereich. Dieser reicht von gegenüber Kontrollen unverändertem Gewicht an Tag 14 nach Transplantation (wie in der vorliegenden Studie) (SHEWCHUK et al., 1996) bis zu 23% Gewichtsverlust nach 42 Tagen (in der vorliegenden Arbeit 5,8% nach 28 Tagen) (LE BRICON et al., 1996).

Dagegen fällt ein statistisch hochsignifikant stärker ausgeprägter Gewichtsverlust der behandelten Tiere auf (19% vs. 5,8% in der Kontrollgruppe). Dies geht einher mit einem tendenziell schlechteren Allgemeinzustand und stärkerer Kachexie der Tiere in dieser Gruppe, wobei die kritische Marke von 30% Gewichtsverlust (TISDALE, 1991) zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht ist.

Wie läßt sich der ausgeprägte Gewichtsverlust der Tiere in der behandelten Gruppe erklären?

Als mögliche Ursachen kommen einerseits verminderte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme durch LU 302872 in Frage. Andererseits wäre eine den katabolen Effekt des Tumors verstärkende Wirkung von LU 302872 über einen noch nicht bekannten Mechanismus vorstellbar.

Bei unbehandelten hepatomtragenden Buffalo-Ratten bleibt die Nahrungsaufnahme bis zum 10. Tag nach Transplantation konstant und sinkt ab diesem Zeitpunkt bis auf ca. 50% (STRELKOV et al., 1989). An gesunden Kontrollen, welche die gleichen Futtermengen bekamen, wie von den hepatomtragenden *ad libitum* aufgenommen wurden, konnte gezeigt werden, daß die verminderte Nahrungszufuhr für 40% des Verlusts an Muskelgewicht verantwortlich ist (STRELKOV et al., 1989). Die Nahrungsaufnahme wurde im durchgeführten Experiment nicht quantifiziert. Trotzdem kann davon

ausgegangen werden, daß sie sich in der unbehandelten Gruppe ähnlich verhält wie von STRELKOV et al. (1989) beschrieben. Stichprobenartig wurde in der behandelten Gruppe eine geringere Nahrungsaufnahme festgestellt.

Sowohl die signifikant verminderte Gesamtproteinkonzentration als auch der signifikant erhöhte Harnstoff sprechen für einen verstärkten Proteinkatabolismus der behandelten Tiere.

An einem anderen Tumormodell zeigte sich (ohne Behandlung) ebenfalls ein Abfall der Nahrungsaufnahme ab dem 10. Tag mit darauffolgendem kompensatorischem Anstieg der Flüssigkeitsaufnahme. Dieser kompensatorische Effekt konnte auch bei gesunden Tieren unter Nahrungsrestriktion beobachtet werden (MORRISON, 1968).

Ein Anstieg der Flüssigkeitsaufnahme wurde im durchgeführten Versuch nicht gemessen. Die Flüssigkeitsaufnahme sank dagegen in beiden Gruppen im Laufe des Versuchs ab. Sie befand sich in der behandelten Gruppe jedoch schon zu Versuchsbeginn auf einem deutlich niedrigeren Niveau.

Sowohl die Implantation des Tumors als auch die Zugabe von *LU 302872* zum Trinkwasser führt in getrennten Experimenten über vier Wochen zu einer Abnahme der Trinkmengen in vergleichbarer Größenordnung. Eine Kombination beider Faktoren (MH-7777 und *LU 302872*) führt schon in der Meßperiode der ersten fünf Tage zu einer Verringerung der Flüssigkeitsaufnahme auf 68%. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, da in diesen ersten Tagen nur verhältnismäßig wenige Tumorzellen vorhanden sind. Offensichtlich reicht die Wirkung dieser wenigen Zellen aus, um zusammen mit *LU 302872* eine drastische Verminderung der Trinkmenge zu bewirken. Über den zugrundeliegenden Mechanismus kann nur spekuliert werden. Möglicherweise produziert das Hepatom einen zirkulierenden Faktor, der zusammen mit *LU 302872* die Diurese herabsetzt oder das Durstempfinden senkt. Möglicherweise wird durch den  $ET_{A/B}$ -Rezeptorantagonisten *LU 302872* in Kombination mit vom MH-7777 freigesetzten Faktoren in die komplexen, in ihren Einzelheiten unverstandenen Wirkungen der Endotheline auf die Salz-Wasser-Regulation eingegriffen. Sowohl Einflüsse auf renaler als auch auf zentral-hormonaler Ebene könnten für die beobachteten Phänomene von Bedeutung sein.

Die in der behandelten Gruppe gemessenen signifikant erhöhten Natriumwerte könnten Ausdruck der geringeren Trinkmenge bzw. des gestörten Wasser/Elektrolyt-Haushalts dieser Tiere sein.

Es kann festgehalten werden, daß die Behandlung mit *LU 302872* bei MH-7777-tragenden Buffalo-Ratten zu einer von Beginn an deutlichen Abnahme der Trinkmenge führt. Diese kann unter Einbeziehung der Vorbefunde nur aus einer gemeinsamen Wirkung des Hepatoms und des Pharmakons erklärt werden. Gleichzeitig scheint sich die Nahrungsaufnahme gegenüber hepatomtragenden Kontrollen zu verringern. Eine ursächliche Beziehung zwischen verminderter Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme der behandelten Tiere sowie dem über das tumorbedingt zu erwartende Maß hinaus verstärkten Gewichtsverlust, erscheint naheliegend. Über welchen Mechanismus *LU 302872* bei hepatomtragenden Tieren zu verminderter Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme und einem möglicherweise zusätzlich direkt katabolen Effekt führt, ist unklar.

Anschließend an diese Überlegungen stellt sich die Frage, welche Wirkung die verminderte Nährstoff- und Flüssigkeitsaufnahme auf das Hepatomwachstum haben könnte.

Allgemein ist davon auszugehen, daß ein maligner Tumor relativ unabhängig vom Ernährungszustand des Wirts wächst, also kaum durch Mangelernährung des Wirts in seinem Wachstum gebremst wird. Vorstellbar wäre im Gegenteil, daß eine katabole Stoffwechsellage durch Schwächung von Abwehrmechanismen das Wachstum eines Tumors verstärkt. Dazu kommt, daß niedrig differenzierte *Morris*-Hepatome, wie das verwendete MH-7777, im Vergleich zu höher differenzierten Hepatomen streßresistenter sind (BLATTEIS et. al., 1980). Außerdem konnte von BLATTEIS et al. (1980) gezeigt werden, daß die errechnete Substratutilisation im Tumorgewebe (Tumorstoffwechsel bezogen auf Nahrungsaufnahme) auch unter Streßbedingungen unverändert hoch ist, während sie im Wirtsorganismus sinkt. Entweder können die Hepatomzellen unter diesen Bedingungen im Gegensatz zum Wirt das verfügbare Substrat weiterhin unverändert gut nutzen oder sie entziehen dem Wirt Teile seines proportionalen Anteils, um sie für das eigene Wachstum zu verbrauchen und damit den allgemeinen Abfall der Substratutilisation zu kompensieren. Für seine Proteinsynthese benutzt das MH-7777 einen beträchtlichen Anteil der Aminosäureaufnahme des Wirts (LE BRICON et al., 1995). In jedem Fall scheint der Wirt unter verminderter Nahrungsaufnahme und anderen Streßfaktoren mehr zu leiden, als der Tumor selbst. Es erscheint also fraglich, ob durch Mangelernährung des Wirts eine Hemmung von MH-Wachstum hervorgerufen werden kann.



Das Wachstum der Tumoren in der unbehandelten Gruppe entspricht annähernd den schon 1969 beschriebenen Größenordnungen eines Gewichts von 12,7 ( $\pm$  3,1) g pro Tumor nach 46 Tagen und einer Verdopplungszeit von 11,7 Tagen (LINDER-HOROWITZ et al., 1969).

Die Organgewichte von Leber, Dünndarm und Epitrochlearismuskel verringern sich nach MH-7777-Transplantation proportional zum abnehmenden Körpergewicht, während die relativen Organgewichte konstant bleiben (LE BRICON et al., 1996). Die in der vorliegenden Arbeit bei den behandelten Tieren gemessenen geringeren Organgewichte von Leber, Niere und Herz ( $p < 0,001$ ) sind wahrscheinlich durch das proportional dazu abnehmende Körpergewicht bedingt. Die relativen Organgewichte unterscheiden sich außer bei den Nieren nicht.

Der herausragendste Befund bei der Betrachtung der Serumwerte ist die signifikante Erhöhung der Transaminasen (Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase) bei den hepatomtragenden Tieren. Dies ist als Ausdruck eines zentral nekrotisierenden heterotopen Lebertumors nicht verwunderlich. Ähnliche, aber statistisch nicht signifikante Verhältnisse werden auch bei den LDH-Konzentrationen als Zeichen einer malignen Erkrankung beobachtet.

Eine Erhöhung des Serumcholesterins wurde auch beim MH-7288CTC und beim Aszites-Hepatom (*Yoshida* AH-130) gemessen (XU et al., 1996; TESSITORE et al., 1993). Eine Erhöhung ist auch deutlich signifikant bei den MH-7777-tragenden Buffalo-Ratten zu beobachten. Durch die Behandlung mit *LU 302872* reduziert sich das Cholesterin wieder in Richtung des Referenzwertes gesunder Tiere, bleibt allerdings weiterhin signifikant erhöht.

Einen weiteren Gesichtspunkt liefert die bisher nicht publizierte Beobachtung, daß Langzeitbehandlung mit einem *Racemat* von *LU 302872* zur Verminderung verschiedener Matrixproteine im Bindegewebe der Niere führt. Diese Substanz scheint also in die Kollagen- bzw. Bindegewebssynthese einzugreifen. Es wäre denkbar, daß der beobachtete schlechtere Allgemeinzustand der behandelten Tiere im Zusammenhang mit einer Kollagenmangelerscheinung steht oder daß die Stromabildung des Tumors beeinflußt wird.

Letztlich ungeklärt bleiben nach der vorliegenden Studie folgende Fragen:

Auf welche Weise führt *LU 302872* zu einer Verminderung der Flüssigkeitsaufnahme? Wie hoch ist der Rückgang der Nahrungsaufnahme und wodurch wird er ausgelöst? Ist der Gewichtsverlust durch verminderte Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme bedingt und/oder gibt es einen direkten Effekt von *LU 302872*? Ist das verminderte Wachstum des MH-7777 in behandelten Tieren ein unspezifischer Effekt oder wird er durch tumorspezifische Wirkung des ET-Rezeptorantagonisten *LU 302872* hervorgerufen?

Die letzte Frage kann möglicherweise nach der geplanten histologischen Untersuchung der Hepatome aus behandelten und unbehandelten Tieren beantwortet werden. Über den Effekt der verminderten Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme auf das Tumorstadium könnte eine Studie Aufschluß geben, in der unbehandelte Tiere die gleichen Nahrungs- und Flüssigkeitsmengen bekommen, wie die behandelten Tiere *ad libitum* zu sich nehmen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im letzten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ob das ET-System für das Hepatomwachstum *in vivo* eine Rolle spielt. Dazu wurde versucht, das Wachstum von MH-7777 in Buffalo-Ratten mit dem neuentwickelten kombinierten ET<sub>A/B</sub>-Rezeptorantagonisten *LU 302872* zu hemmen. Dieser hatte *in vitro* die deutlichste Proliferationshemmung hervorgerufen. *In vivo* könnte auch die Beeinflussung von Tumorangiogeneseprozessen sowohl über den ET<sub>A</sub>- als auch über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor von Bedeutung sein. Außerdem spielen die *in vivo* zusätzlich vorhandenen Wachstumsfaktoren in ihrer Wechselwirkung mit ET-1 wahrscheinlich eine Rolle.

Die absolute Größe der Hepatome ist im Verlauf der Behandlung an den verschiedenen Meßpunkten um durchschnittlich 9-21% geringer als in der unbehandelten Gruppe ( $p < 0,05$ ). Der hochsignifikant stärkere Gewichtsverlust der behandelten Tiere könnte aus der verminderten Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme resultieren. Die Kombination der Faktoren MH-7777-Transplantation und *LU 302872*-Gabe führt unerwarteterweise schon nach kürzester Zeit zu einer drastischen Abnahme der Trinkmenge, was vielleicht die Ursache für die erhöhten Natriumwerte ist. Möglicherweise trägt *LU 302872* auch über einen anderen unbekannten Mechanismus zur katabolen Stoffwechsellaage der behandelten Tiere bei, die sich in einem schlechteren Allgemeinzustand, verminderter Gesamtproteinkonzentration und erhöhter Harnstoffkonzentration

---

im Serum ausdrückt. Unklar bleibt, ob die Verringerung der absoluten Tumormaße durch einen unspezifischen Effekt hervorgerufen wird oder ob es einen spezifischen Effekt durch Angriff am ET-System gibt. Eher *für* einen spezifischen Effekt spricht die beschriebene Streßresistenz von undifferenzierten *Morris*-Hepatomen sowie eine bei Mangelernährung konstante Substratutilisation seitens der Tumorzellen im Gegensatz zum Wirtsorganismus. Genauere Erkenntnisse über durch *LU 302872* hervorgerufene spezifische Effekte am Hepatom, können möglicherweise die Ergebnisse der geplanten histologischen Analysen hinsichtlich möglicher Unterschiede der Gefäßdichte, Apoptoserate, Metastasenrate und anderer Meßgrößen in den Hepatomen und Lebern der behandelten und unbehandelten Buffalo-Ratten liefern.



## 5 Zusammenfassung

Das 1988 von YANAGISAWA et al. entdeckte Peptid Endothelin-1 (ET-1) hat neben seiner vasokonstriktorisches Wirkung auch wachstumsinduzierende Eigenschaften. *In vitro* wurde vielfach nachgewiesen, daß ET verschiedene neoplastische Zellen in ihrer Proliferation verstärkt und daß dieser Effekt durch ET-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden kann. *In vivo* zeigte sich, daß einige maligne Tumoren ET-1 synthetisieren und peripher erhöhte Plasmakonzentrationen von ET-1 und seinem Vorläufer Big-ET-1 meßbar sind. Jedoch bleibt die tatsächliche Bedeutung des ET-Systems für das Wachstum maligner Zellen und die Angiogenese in Tumoren *in vivo* weiterhin ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das ET-System des experimentellen Lebertumors Morris-Hepatom (MH)-7777 *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Erstmals wurde versucht, Tumorstadium auch *in vivo* durch Behandlung mit einem ET-Rezeptorantagonisten zu inhibieren, um Informationen über die Bedeutung des ET-Systems für das Wachstum maligner Tumoren im Wirtsorganismus zu gewinnen.

1. Im Kulturüberstand von MH-7777-Zellen wurde die Menge des synthetisierten immunreaktiven (ir) ET-1 gemessen. Über Proliferationsassays erfolgte die Untersuchung des Zellwachstums bei Inkubation mit verschiedenen ET-1-Konzentrationen sowie den ET-Rezeptorantagonisten BQ 123, LU 135252 und LU 302872.
2. Zur Charakterisierung des ET-Systems im MH-7777 *in vivo* wurden die ir(Big-)ET-1-Plasmakonzentrationen heptomtragender und gesunder Buffalo-Ratten bestimmt. Außerdem wurden die ir(Big-)ET-1-Gewebekonzentrationen im MH-7777 mit denen von Lebergewebe verglichen. Die Messung der ET-Rezeptordichte und deren Affinität im MH-7777 erfolgte über *Scatchard*-Rezeptor-Bindungsstudien.
3. Einer Gruppe von 44 Buffalo-Ratten wurde jeweils beidseitig das MH-7777 in die Oberschenkelmuskulatur transplantiert. Die Hälfte der Tiere erhielt ab Transplantation den kombinierten ET<sub>A/B</sub>-Rezeptorantagonisten LU 302872 (40-80 mg/kg×d) mit dem Trinkwasser. Über 28 Tage wurde insbesondere das Tumorstadium durch regelmäßige transkutane Messung mit einer Präzisionsschublehre verfolgt. Auch sonographische Volumenbestimmungen wurden durchgeführt. Anschließend wurden Hepatome und Organe entnommen, gewogen und vermessen. Serum wurde zu Analyse Zwecken entnommen.

Die Ergebnisse zeigen eine endogene irET-1-Produktion der MH-7777-Zellen, die im Kulturmedium mitogen wirksame Konzentrationen erreicht. Exogene ET-1-Stimulation der Zellen bewirkt eine (auch optisch zu verifizierende) Proliferationssteigerung ( $p < 0,05$ ). Die Proliferationshemmung durch die beiden ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten ist schwächer ausgeprägt als die in beiden Proliferationsassays bestätigte ca. 50%ige Hemmung ( $p < 0,05$ ) durch den kombinierten ET<sub>A/B</sub>-Rezeptorantagonisten *LU 302872* ( $10^{-4}$  mol/l). Deshalb wurde dieser auch im Tierversuch eingesetzt. Toxische Effekte der Substanzen *in vitro* konnten weitgehend ausgeschlossen werden.

Trotz im Vergleich zu Lebergewebe deutlich erhöhter Gewebe-(Big-)ET-1-Konzentrationen im Hepatom ( $p < 0,05$ ), ruft der Tumor keine Erhöhung der Plasmakonzentrationen hervor. Im Einklang mit den Ergebnissen aus der Zellkultur legt dies eine par- oder autokrine ET-1-Wirkung nahe. Die ET<sub>A</sub>-Rezeptordichte ist im MH-7777 im Vergleich zu Kontrolleber bei männlichen Tieren um 67% erhöht, während die ET<sub>B</sub>-Rezeptordichte (ähnlich dem Prostatakarzinom) geschlechtsunabhängig um 59% verringert ist ( $p < 0,05$ ).

Die absoluten Größen von Durchmesser und Volumen der Hepatome sind bei den mit *LU 302872* behandelten Tieren je nach Meßmethode und Beobachtungszeitpunkt um 9-21% geringer als bei den Kontrollen ( $p < 0,05$ ). Der hochsignifikant stärkere Gewichtsverlust der behandelten Tiere könnte aus der verminderten Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme resultieren. Lediglich die Kombination der Faktoren Tumortransplantation und *LU 302872*-Gabe führt unerwarteterweise nach kürzester Zeit zu einer drastischen Abnahme der Trinkmenge. Möglicherweise trägt der neuentwickelte ET-Rezeptorantagonist *LU 302872* auch über andere Mechanismen zur schlechteren Stoffwechsellage der behandelten Tiere bei.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das ET-System für das MH-7777 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Bedeutung hat.

Welche Rolle die im Hepatom beobachtete (geschlechtsabhängige) ET-Rezeptorverschiebung im einzelnen spielt, muß in weiteren Studien gezielt untersucht werden. Unklar bleibt auch, ob die Verringerung der absoluten Tumormaße *in vivo* durch einen unspezifischen Effekt hervorgerufen wird oder ob spezifische Angriffe am ET-System involviert sind. Geplante histologische Untersuchungen der Tumoren geben darüber möglicherweise weiteren Aufschluß. Ergänzende Studien mit alternativen Applikationsformen und anderen ET-Rezeptorantagonisten erscheinen aussichtsreich.

## 5.1 Summary

The peptide endothelin-1 (ET-1), discovered by YANAGISAWA et al. in 1988, has growth-promoting properties besides its vasopressor characteristic. *In vitro* ET has been shown to increase proliferation of a variety of neoplastic cells. This effect can be abolished by ET receptor antagonists. *In vivo* a number of malign tumors produce ET. Also elevated plasma levels of ET-1 and its precursor big-ET-1 have been reported. However, the actual importance of the ET system for growth and angiogenesis in tumors *in vivo* remains unclear.

In the present study the ET system of the experimental liver tumor *Morris* hepatoma (MH) 7777 was characterized *in vitro* and *in vivo*. For the first time it was tried to inhibit tumor growth *in vivo* by treatment with an ET receptor antagonist in order to gain information about the ET systems importance for malign tumor growth within the host organism.

1. The endogenously produced immunoreactive (ir) ET-1 was quantified in the supernatant of MH-7777 cells. Cell growth at incubation with different concentrations of ET-1 and the ET receptor antagonists *BQ 123*, *LU 135252* and *LU 302872* was evaluated performing cell proliferation assays.
2. In order to characterize the ET system in MH-7777 *in vivo* ir(big-)ET-1 levels of hepatoma-bearing and healthy Buffalo rats were determined. In addition ir(big-)ET-1 tissue levels were compared to the levels of normal liver tissue. ET receptor density and affinity in hepatoma was determined performing *Scatchard* receptor binding assays.
3. MH-7777 was transplanted into both hindlimbs of 44 Buffalo rats. Beginning right after transplantation half of them were applied the combined ET<sub>A/B</sub> receptor antagonist *LU 302872* (40-80 mg/kg×d) added to the drinking water. For 28 days especially the tumor growth was followed up by regular transcutaneous measurement using a precision caliper. Volume determinations using ultrasound were additionally performed. At time of killing hepatomas and organs were excised, weighed and measured. Serum was taken for analysis.

The results show an endogenous ET-1 production of MH-7777 cells reaching mitogenic concentrations in culture media. Exogenous ET-1 stimulation causes a

(microscopically confirmed) increase in cell proliferation ( $p < 0,05$ ). Growth inhibitory action of ET<sub>A</sub>-receptor antagonists is not as strong as the 50% inhibition ( $p < 0,05$ ) seen after incubation with the combined ET<sub>A/B</sub> receptor antagonist *LU 302872* ( $10^{-4}$  mol/l). The latter was confirmed in both proliferation assays. This fact influenced the decision to use *LU 302872* in the animal experiment. Toxic effects of the tested antagonists *in vitro* were excluded.

Despite the clearly elevated tissue (big-)ET-1 levels in hepatoma compared to liver tissue ( $p < 0,05$ ) no elevation of plasma levels was observed. Together with the mentioned findings of the cell culture experiments these results suggest a paracrine or autocrine way of ET action. ET<sub>A</sub> receptor density in hepatoma of male rats was shown to be increased by 67% compared to normal liver tissue, whereas ET<sub>B</sub> receptor density is reduced (as in prostate cancer) by 59% regardless of sex ( $p < 0,05$ ).

Looking at diameter and volume, the absolute hepatoma sizes are 9-21% smaller in animals receiving *LU 302872* treatment ( $p < 0,05$ ). The highly significant weight loss of treated animals might be a result of reduced food and water intake. Only the combination of tumor transplantation and ingestion of *LU 302872* unexpectedly leads to an immediate drastic reduction of water intake. There might be other effects of the newly developed ET receptor antagonist *LU 302872* contributing to the impaired metabolic state of the treated animals.

The present study indicates that the ET system is relevant to growth of MH-7777 both *in vitro* and *in vivo*.

The detailed role of the observed (sex-dependent) ET receptor shift in hepatoma tissue has to be elucidated by further specific investigation. It also remains unclear whether the reduction of absolute tumor size *in vivo* is caused by an unspecific effect or whether specific influence focused on the ET system is involved. Planned histologic evaluation of the tumors might give more information on this question. Complimentary studies checking alternative forms of application and different ET receptor antagonists seem to be promising.



## 6 Literaturverzeichnis

- ÄNGGÅRD E, GALTON S, RAE G, ET AL. (1989)  
The fate of the radioiodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13 (Suppl. 5): S46-S49
- ARAI H, HORI S, ARAMORI I, OHKUBO H, NAKANISHI S (1990)  
Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor.  
*Nature* 348: 730-732
- ARAI H, NAKAO K, TAKAYA K, HOSODA K, OGAWA Y, NAKANISHI S, IMURA H (1993)  
The human endothelin B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment.  
*J. Biol. Chem.* 268: 3463-3470
- ASHAM EH, LOIZIDOU M, TAYLOR I (1998)  
Endothelin-1 and tumour development.  
*Eur. J. Surg. Oncol.* 24: 57-60
- BAGNATO A, TECCE R, DI CASTRO V, CATT KJ (1997)  
Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells.  
*Cancer Res.* 57: 1306-1311
- BAGNATO A, VENUTI A, DI CASTRO V, MARCANTE ML (1995)  
Identification of the ET<sub>A</sub> receptor subtype that mediates endothelin induced autocrine proliferation of normal human keratinocytes.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209: 80-86
- BAKRIS GL, FAIRBANKS R, TRAISH AM, AKERSTORM V, KERN S (1991)  
Arginine vasopressin stimulates human mesangial cell production of endothelin.  
*J. Clin. Invest.* 87: 1158-1164
- BANNASCH P (1996)  
Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes.  
*Prog. Liver Dis.* 14: 161-197
- BANNASCH P, ENZMANN H, KLIMEK F, WEBER E, ZERBAN H (1989)  
Significance of sequential cellular changes inside and outside foci of altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis.  
*Toxicol. Pathol.* 17(4): 617-629
- BANNASCH P, MAYER D, HACKER HJ (1980)  
Hepatocellular glycogenosis and hepatocarcinogenesis.  
*Biochim. Biophys. Acta* 605: 217-245
- BATTISTINI B, CHAILLER P, D'ORLÉANS-JUSTE P, BRIÈRE N, SIROIS P (1993b)  
Growth regulatory properties of endothelins.  
*Peptides* 14: 385-399
- BATTISTINI B, D'ORLÉANS-JUSTE P, SIROIS P (1993a)  
Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids.  
*Lab. Invest.* 68: 600-628
- BAX WA, SAXENA PR (1994)  
The current endothelin receptor classification: Time for reconsideration?  
*Trends Pharmacol. Sci.* 15: 379-386
- BAYNASH AG, HOSODA K, GIAID A, RICHARDSON JA, EMOTO N, HAMMER RE (1994)  
Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons.  
*Cell* 79: 1277-1285
- BENIGNI A, GASPARI F, ORISIO S, BELLIZI L, AMUSO G, FRUSCA T, REMUZZI G (1991a)  
Human placenta expresses endothelin gene and corresponding protein is excreted in urine in increasing amounts during normal pregnancy.  
*Am. J. Obstet. Gynecol.* 164: 844-848

- BENIGNI A, PERICO N, LADNY JR, IMBERTI O, BELLIZZI L, REMUZZI G (1991b)  
Increased urinary excretion of endothelin 1 and its precursor, Big endothelin 1, in rats chronically treated with cyclosporine.  
*Transplantation* 52: 175-177
- BERRIDGE MV, TAN AS (1993)  
Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 303: 474-482
- BERRIDGE MV, TAN AS (1992)  
The protein kinase C inhibitor calphostin C, inhibits succinate-dependent mitochondrial reduction of MTT by a mechanism that does not involve protein kinase C.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 806-811
- BERRIDGE MV, TAN AS, MCCOY K, WANG R (1997)  
The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts.  
*Biochemica Information, Boehringer Mannheim, Mannheim* 100: 15-20
- BIRNBAUMER L, ABRAMOWITZ J, BROWN AM (1990)  
Receptor-effector coupling by G-proteins.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1031: 163-224
- BLATTEIS CM, CARDOSO SS, NARAYANAN TK, HUGHES MH, MORRIS HP (1980)  
Depressed growth of Morris hepatomas in altitude- and heat-stressed but not in cold-stressed buffalo rats.  
*J. Natl. Cancer Inst.* 64: 1451-1458
- BLOCH KD, EDDY RL, SHOWS TB, QUERTERMOUS T (1989a)  
cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3.  
*J. Biol. Chem.* 264: 18156-18161
- BLOCH KD, FRIEDRICH SP, LEE ME, EDDY RL, SHOWS TB, QUERTERMOUS T (1989b)  
Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin.  
*J. Biol. Chem.* 264: 10851-10857
- BOGOYEYITCH MA, GLENNON PE, ANDERSSON MB, CLERK A, LAZOU A, MARSHALL CJ, PARKER PJ, SUDGEN PH (1994)  
Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy.  
*J. Biol. Chem.* 269: 1110-1119
- BOULANGER C, LUSCHER TF (1990)  
Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide.  
*J. Clin. Invest.* 85: 587-590
- BOULANGER CM, TANNER FC, BEA ML, HAHN AWA, WERNER A, LUSCHER TF (1992)  
Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium.  
*Circ. Res.* 70: 1191-1197
- CASASCO A, CALLIGARO A, CASASCO M, SPRINGALL DR, TENTI P, MARCHETTI C, POGGI P, POLAK JM (1991)  
Immunohistochemical localization of endothelin-like immunoreactivity in human tooth germ and mature dental pulp.  
*Anat. Embryol. (Berl.)* 183: 515-520
- CASEY ML, WORD RA, MACDONALD PC (1991)  
Endothelin-1 gene expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in a vascular human amnion.  
*J. Biol. Chem.* 266: 5762-5768
- CLOZEL M, BREU V, GRAY GA, KALINA B, LÖFFLER BM, BURRI K, CASSAL JM, HIRTH G, MÜLLER M, NEIDHART W, RAMUZ H (1994)  
Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 228-235

- CLOZEL M, CLOZEL JP (1989)  
Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 1125-1131
- CLOZEL M, LOFFLER BM, BREU V, HILFINGER L, MAIRE JP, BUTSCHA (1993)  
Downregulation of endothelin receptors by autocrine production of endothelin-1.  
*Am. J. Physiol.* 265: 188-192
- COCKS TM, BROUGHTON A, DIB M, SUDHIR K, ANGUS JA (1989)  
Endothelin is blood vessel selective: studies on a variety of human and dog vessels in vitro and on regional blood flow in the conscious rabbit.  
*Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 16: 243-246
- CORASANITI MT, MELINO G, TARTAGLIA RL, FINAZZI-AGRO A, NISTICO G (1994)  
N-methyl-D-aspartate-induced excessive formation of nitric oxide in CHP100 neuroblastoma cells produces death of BMEL melanoma cells in co-culture.  
*Neuropharmacology* 33: 1071-1077
- DAVENPORT AP, NUNEZ DJ, HALL JA, KAUMANN AJ, BROWN MJ (1989)  
Autoradiographical localization of binding sites for porcine 125I-endothelin-1 in humans, pigs, and rats: functional relevance in humans.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13 (Suppl. 5): S166-S170
- DE NUCCI G, THOMAS GR, D'ORLÉANS-JUSTE P, ET AL. (1988)  
Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9797-9800
- DOHI Y, LUSCHER TF (1991)  
Endothelin in hypertensive resistance arteries. Intraluminal and extraluminal dysfunction.  
*Hypertension* 18: 543-549
- DOUGLAS SA, HILEY CR (1990)  
Endothelium-dependent vascular activities of endothelin-like peptides in the isolated superior mesenteric arterial bed of the rat.  
*Br. J. Pharmacol.* 101: 81-88
- DOUGLAS SA, LOUDEN C, VICKERY-CLARK LM, STORER BL, HART T, FEUERSTEIN GZ, ELLIOT JD, OHLSTEIN EH (1994)  
A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effect of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670.  
*Circ. Res.* 75: 190-197
- DUPUIS J, STEWART DJ, CERNACEK P, GOSSELIN G (1996)  
Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1.  
*Circulation* 94: 1578-1584
- ECONOMOS K, MACDONALD PC, CASEY ML (1992a)  
Endothelin-1 gene expression and biosynthesis in human endometrial HEC-1A cancer cells.  
*Cancer Res.* 52: 554-557
- ECONOMOS K, MACDONALD PC, CASEY ML (1992b)  
Endothelin-1 gene expression and protein synthesis in human endometrium: potential modulator of endometrial blood flow.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 14-19
- EDWARDS RM, TRIZNA W, OHLSTEIN EH (1990)  
Renal microvascular effects of endothelin.  
*Am. J. Physiol.* 259: F217-F221
- EGUCHI S, HIRATA Y, IHARA M, YANO M, MARUMO F (1992a)  
A novel ET<sub>A</sub> antagonist (BQ 123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells.  
*FEBS Lett.* 302: 243-246

- EGUCHI S, HIRATA Y, IMAI T, KANNO K, AKIBA T, SAKAMOTO A, YANAGISAWA M, MASAKI T, MARUMO F (1992b)  
Endothelin receptors in human parathyroid gland.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 1448-1455
- EGUCHI S, HIRATA Y, IMAI T, MARUMO F (1995)  
ET-1 as an autocrine growth factor for endothelial cells.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (Suppl. 3): S279-S283
- EMORI T, HIRATA Y, OHTA K, ET AL. (1991)  
Cellular mechanisms of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin.  
*Hypertension* 18: 165-170
- ENDO S, INOOKA H, ISHIBASHI Y, KITADA C, MIZUTA E, FUJINO M (1989)  
Solution conformation of endothelin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry.  
*FEBS Lett.* 257: 149-154
- ERDSTEIN J, GUYDA JH, MISHKIN S (1984)  
Effects of hypophysectomy and hormone replacement on the local and metastatic growth of Morris hepatoma no. 44.  
*Cancer Res.* 44: 2936-2941
- ERDSTEIN J, WISEBORD S, MISHKIN SY, MISHKIN S (1989)  
The effect of several sex steroid hormones on the growth rate of three Morris hepatoma tumor lines.  
*Hepatology* 9: 621-624
- EZRA D, GOLDSTEIN RE, CZAJA JF, FEUERSTEIN GZ (1989)  
Lethal ischemia due to intracoronary endothelin in pigs.  
*Am. J. Physiol.* 257: H339-H343
- FIRTH JD, RATCLIFFE PJ, RAINE AE, LEDIGHAM JG (1988)  
Endothelin: an important factor in acute renal failure?  
*Lancet ii*: 1179-1182
- FUKO K, HATA S, SUHARA T, NAKAHASHI T, SHINTO Y, TSUJIMOTO Y, ET AL. (1996)  
Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle.  
*Hypertension* 27: 823-826
- FUKURODA T, FUJIKAWA T, OZAKI S, ISHIKAWA K, YANO M, NISHIKIBE M (1994)  
Clearance of circulating endothelin-1 by ET<sub>B</sub> receptors in rats.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 1461-1465
- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV (1980)  
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin.  
*Nature* 288: 373-376
- FYHRQUIST F, SAIJONMAA O, METSARINNE K, TIKKANEN I, ROSENLOF K, TIKKANEN T (1990)  
Raised plasma endothelin-1 concentration following cold pressure test.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 217-221
- GANDHI CR, BEHAL RH, HARVEY SA, NOUCHI TA, OLSON MS (1992)  
Hepatic effects of endothelin. Receptor characterization and endothelin-induced signal transduction in hepatocytes.  
*Biochem. J.* 287: 897-904
- GARDINER SM, COMPTON AM, KEMP PA, BENNET T (1990)  
Regional and cardiac hemodynamic responses to glycerol trinitrate, acetylcholine, bradykinine and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester.  
*Br. J. Pharmacol.* 101: 632-639
- GIAID A, GIBSON SJ, HERRERO MT, GENTLEMAN S, LEGON S, YANAGISAWA M, MASAKI T, IBRAHIM NB, ROBERTS GW, ROSSI ML, ET AL. (1991)  
Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurones of the human brain.  
*Histochemistry* 95: 303-314

- GIAID A, GIBSON SJ, LEGON S, BLOOM SR, YANAGISAWA M, MASAKI T, VARNDELL IM, POLAK JM (1989)  
Endothelin 1, an endothelium derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7634-7638
- GIAID A, HAMID QA, SPRINGALL DR, YANAGISAWA M, SHINMI O, SAWAMURA T, MASAKI T, KIMURA S, CORRIN B, POLAK JM (1990)  
Detection of endothelin immunoreactivity and mRNA in pulmonary tumors.  
J. Pathol. 162: 15-22
- GILLESPIE MN, OWASOYO JD, MCMURTRY IF, O'BRIEN RF (1986)  
Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 236: 339-343
- GOLIGORSKI MS, TSUKAHARA H, MAGAZINE H, ANDERSEN TT, MALIK AB, BAHOU WF (1994)  
Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide.  
J. Cell. Physiol. 158: 485-494
- GRAY GA, WEBB DJ (1996)  
The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease.  
Pharmacol. Ther. 72: 109-148
- GRIENDLING KK, TSUDA T, ALEXANDER RW (1989)  
Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells.  
J. Biol. Chem. 264: 8237-8240
- GUO X, OKADA K, FUJITA N, ISHIKAWA S, KOMATSU N, SAITO T (1996)  
Inhibitory effect of BQ-123 on endothelin-1-stimulated mitogen-activated protein kinase and cell growth of rat vascular smooth muscle cells.  
Hypertens. Res. 19: 23-30
- HAENDLER B, HECHLER U, SCHLEUNING WD (1992)  
Molecular cloning of human endothelin (ET) receptors ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>.  
J. Cardiovasc. Pharmacol. 20 (Suppl. 12): S1-S4
- HAHN AW, RESINK TJ, SCOTT-BURDEN T, POWELL J, DOHI Y, BUHLER FR (1990)  
Stimulation of ET mRNA and secretion in rat VSMC: A novel autocrine function.  
Cell Regul. 1: 649-659
- HARRISON VJ, BARNES K, TURNER AJ, WOOD E, CORDER R, VANE JR (1995)  
Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6344-6348
- HICKEY KA, RUBANYI GM, PAUL RJ, HIGHSMITH RF (1985)  
Characterisation of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells.  
Am. J. Physiol. 248: C550-C556
- HIRATA Y, EMORI T, EGUCHI S, KANNO K, IMAI T, OHTA K, MARUMO F (1993)  
Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells.  
J. Clin. Invest. 91: 1367-1373
- HIRATA Y, FUKUDA Y, YOSHIMI H, EMORI T, SHICHIRI M, MARUMO F (1989)  
Specific receptor for ET in cultured rat cardiocytes.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 160: 1438-1444
- HIRATA Y, YOSHIMI H, TAKATA S, ET AL. (1988)  
Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 154: 868-875
- HOCHER B, ABOU-REBYEH H, PLAUM M, FAKHURY M, SCHILLER S, BAUER C (1994)  
Expression of the erb B oncogene in the Morris hepatoma 7777.  
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 32: 697-704

- HOCHER B, ROHMEISS P, ZART R, DIEKMANN F, BRAUN C, KOPPENHAGEN K, BAUER C, DISTLER A, GRETZ N (1995a)  
Distribution of endothelin receptor subtypes in the rat kidney. Renal and haemodynamic effects of the mixed (A/B) endothelin receptor antagonist bosentan.  
*Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33: 463-472
- HOCHER B, RUBENS C, HENSEN J, GROSS P, BAUER C (1992)  
Intracellular distribution of endothelin-1 receptors in rat liver cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 498-503
- HOCHER B, ZART R, DIEKMANN F, SLOWINSKI T, THÖNE-REINEKE C, LUTZ J, BAUER C (1995b)  
Role of the paracrine liver endothelin system in the pathogenesis of CCl<sub>4</sub>-induced liver injury.  
*Eur. J. Pharmacol.* 293: 361-368
- HOSODA K, HAMMER RE, RICHARDSON JA, BAYNASH AG, CHEUNG JC, GIAID A (1994)  
Targeted and neutral (Pibald-Lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produces megacolon associated with spotted coat color in mice.  
*Cell* 79: 1267-1276
- HOSODA K, NAKAO K, HIROSHI-ARAI, SUGA S, OGAWA Y, MUKOYAMA M, SHIRAKAMI G, SAITO Y, NAKANISHI S, IMURA H (1991)  
Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA.  
*FEBS Lett.* 287: 23-26
- HOUSSET C, ROCKEY DC, BISSEL DM (1993)  
Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9266-9270
- HOWARD PG, PLUMPTON C, DAVENPORT AP (1992)  
Anatomical localisation and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue.  
*J. Hypertens.* 10: 1379-1386
- IHARA M, NOGUCHI K, SAEKI T, FUKURODA T, TSUCHIDA S, KIMURA S, FUKAMI T, ISHIKAWA K, NISHIKIBE M, YANO M (1992)  
Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET<sub>A</sub> receptor.  
*Life Sci.* 50: 247-255
- INAGAKI H, BISHOP AE, EIMOTO T, POLAK JM (1992)  
Autoradiographic localization of endothelin-1 binding sites in human colonic cancer tissue.  
*J. Pathol.* 168: 263-267
- INOUE A, YANAGISAWA M, KIMURA S, KASUYA Y, MIYAUCHI T, GOTO K, MASAKI T (1989a)  
The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2863-2867
- INOUE A, YANAGISAWA M, TAKUWA Y, MITSUI Y, KOBASHI M, MASAKI T (1989b)  
The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression.  
*J. Biol. Chem.* 264: 14654-14959
- ISHIBASHI M, FUJITA M, NAGAI K, KAKO M, FURUE H, HAKU E, OSAMURA Y, YAMAJI T (1993)  
Production and secretion of endothelin by hepatocellular carcinoma.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 378-383
- ISHIKAWA T, YANAGISAWA M, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T (1988b)  
Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria.  
*Am. J. Physiol.* 255: H970-H973
- ISHIKAWA T, YANAGISAWA M, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T (1988a)  
Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide.  
*Pflügers Arch.* 413: 108-110
- ITOY Y, YANAGISAWA M, OHKUBO S, KIMURA C, INOUE A, ISHIDA N, MITSUI Y, ONDA H, FUJINO M, MASAKI T (1988)  
Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin; identity of human and porcine endothelin.  
*FEBS Lett.* 231: 440-444

- JENKINS DC, CHARLES IG, THOMSEN LL, MOSS DW, HOLMES LS, BAYLIS SA, RHODES P, WESTMORE K, EMSON PC, MONCADA S (1995)  
Roles of nitric oxide in tumor growth.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4392-4396
- JOUNEUX C, MALLAT A, SERRADEIL-LE GAL, GOLDSMITH P, HANOUNE J, LOTERSZTAJN S (1994)  
Coupling of endothelin B receptors to the calcium pump and phospholipase C via Gs and Gq in rat liver.  
J. Biol. Chem. 269: 1845-1851
- KANSE SM, TAKAHASHI K, WARREN JB, GHATEI M, BLOOM SR (1991)  
Glucocorticoids induce endothelin release from vascular smooth muscle cells but not endothelial cells.  
Eur. J. Pharmacol. 199: 99-101
- KAR S, YOUSEM SA, CARR BI (1995)  
Endothelin-1 expression by human hepatocellular carcinoma.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 216: 514-519
- KARNE S, JAYAWICKREME CK, LERNER MR (1993)  
Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET<sub>C</sub> receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores.  
J. Biol. Chem. 268: 19126-19133
- KASUYA Y, DOBAYASHI H, UEMURA H (1991)  
Endothelin like immunoreactivity in the nervous system of invertebrates and fish.  
J. Cardiovasc. Pharmacol. 17 (Suppl. 7): S463-S466
- KASUYA Y, TAKUWA Y, YANAGISAWA M, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T (1989)  
Endothelin-1 induces vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 161: 1049-1055
- KIKUCHI K, NAKAGAWA H, KADONO T, ETOH T, BYERS H, MIHM M, TAMAKI K (1996)  
Decreased ET<sub>B</sub> receptor expression in human metastatic melanoma cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 219: 734-739
- KIMURA S, KASUYA Y, SAWAMURA T, ET AL. (1988)  
Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 156: 1182-1186
- KIMURA S, KASUYA Y, SAWAMURA T, SHINMI O, SUGITA Y, YANAGISAWA M, GOTO K, MASAKI T (1989)  
Conversion of big endothelin-1 to 21 residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity.  
J. Cardiovasc. Pharmacol. 13 (Suppl. 5): S5-S7
- KIOWSKI W, SÜTSCH G, HUNZIKER P, MÜLLER P, KIM J, OESCHLIN E (1995)  
Evidence for endothelin-1 mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure.  
Lancet 346: 732-736
- KITAGAWA N, TSUTSUMI K, NIWA M, YAMAGA S, ANDA T, KHALID H, HIMENO A, TANIYAMA K, SHIBATA S (1994)  
A selective endothelin ET<sub>A</sub> antagonist, BQ-123, inhibits 125I-endothelin-1 (125I-ET-1) binding to human meningiomas and antagonizes ET-1-induced proliferation of meningioma cells.  
Cell. Mol. Neurobiol. 14: 105-118
- KITASJIMA I, KAWAHARA K, NAKAJIMA T, SOEJIMA Y, MATSUYAMA T, MARUYAMA I (1994)  
Nitric oxide-mediated apoptosis in murine mastocytoma.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 204: 244-251
- KLOOG Y, AMBAR I, SOKOLOVSKY M, KOCHVA E, WOLLBERG Z, BDOLAH A (1988)  
Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain.  
Science 242: 268-270
- KOMURO I, KURIHARA H, SUGIYAMA T, YOSHIZUMI M, TAKAKU F, YAZAKI Y (1988)  
Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells.  
FEBS Lett. 238: 249-252
- KOUREMBANAS S, MARSDEN PA, MCQUILLAN LP, FALLER DV (1991)  
Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium.  
J. Clin. Invest. 88: 1054-1057

- KUCHAN MJ, FRANGOS JA (1993)  
Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells.  
*Am. J. Physiol.* 264: H150-H156
- KURIHARA H, YOSHIKUMI M, SUGIYAMA T, ET AL. (1989a)  
Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 1435-1440
- KURIHARA H, YOSHIKUMI M, SUGIYAMA T, ET AL. (1989b)  
The possible role of endothelin-1 in the pathogenesis of coronary vasospasms.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13 (Suppl. 5): S132-S137
- KURIHARA M, OCHI A, KAWAGUCHI T, NIWA M, KATAOKA Y, MORI K (1990)  
Localization and characterization of endothelin receptors in human gliomas: a growth factor?  
*Neurosurg.* 27: 275-281
- KURIHARA Y, KURIHARA H, ODA H, ET AL. (1995)  
Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1.  
*J. Clin. Invest.* 96: 293-300
- KURIHARA Y, KURIHARA H, SUZUKI H, KODAMA T, MACMURA K, NAGAI R (1994)  
Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1.  
*Nature* 368: 703-710
- KUSUHARA M, YAMAGUCHI K, NAGASAKI K, HAYASHI C, SUZAKI A, HORI S, HANDA S, NAKAMURA Y, ABE K (1990)  
Production of endothelin in human cancer cell lines.  
*Cancer Res.* 50 (Suppl. 11): 3257-3261
- KUSUHARA M, YAMAGUCHI K, OHNISHI A, ABE K, KIMURA S, OONO H, HORI S, NAKAMURA Y (1989)  
Endothelin potentiates growth-factor stimulated DNA synthesis in Swiss 3T3 cells.  
*Cancer Res.* 80: 302-305
- LAGENTE V, CHABRIER PE, MENCIA-HUERTA JM, BRAQUET P (1989)  
Pharmacological modulation of the bronchiopulmonary action of the vasoactive peptide, endothelin, administered by aerosol in the guinea-pig.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 625-632
- LANDAN G, BDOLAH A, WOLLBERG Z, KOCHVA E, GRAUR D (1991)  
Evolution of the sarafotoxin/endothelin superfamily of proteins.  
*Toxicon* 29: 237-244
- LE BRICON T, CYNOBER L, BARACOS VE (1996)  
Protein metabolism in cachectic tumor-bearing rats: effect of tumor excision.  
*J. Surg. Res.* 60: 207-215
- LE BRICON T, CYNOBER L, FIELD CJ, ET AL. (1995)  
Supplemental nutrition with ornithine alpha-ketoglutarate in rats with cancer-associated cachexia: Surgical treatment of the tumor improves efficacy of nutritional support.  
*J. Nutr.* 125: 2999-3010
- LEE ME, DE LA MONTE SM, NG SC, BLOCH KD, QUERTERMOUS T (1990)  
Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system.  
*J. Clin. Invest.* 86: 141-147
- LERMAN A, HILDEBRAND FL, AARHUS LL, BURNETT JC (1991)  
Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations.  
*Circulation* 83: 1808-1814
- LINDER-HOROWITZ M, KNOX WE, MORRIS HP (1969)  
Glutaminase activities and growth rates of rat hepatomas.  
*Cancer Res.* 29: 1195-1199
- LOESCH A, TURMAINE M, LOIZIDOU M, CROWE R, ASHRAF S, TAYLOR I (1997)  
Increase in immunoreactivity for endothelin-1 in blood vessels of rat liver metastases: experimental sarcoma and carcinoma.  
*J. Anat.* 191: 291-299



- LOPEZ-FARRE A, MONTANES I, MILLUS I, LOPEZ-NOVA JM (1989)  
Effect of endothelin on renal function in rats.  
*Eur. J. Pharmacol.* 163: 187-189
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951)  
Protein measurement with the folin phenol reagent.  
*J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- MAACK T, SUZUKI M, ALMEIDA FA, NUSSENZVEIG D, SCARBOROUGH RM, MCENROE GA, LEWICKI JA (1987)  
Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor.  
*Science* 238: 675-678
- MACCUMBER MW, ROSS CA, SNYDER SH (1990)  
Endothelin in brain: Receptors, mitogenesis and biosynthesis in glial cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2359-2363
- MALLAT A, FOUASSIER L, PRÉAUX AM, SERADEIL-LE GAL C, RAUFASTE D, ROSENBAUM J, DHUMEAUX D, JOUNEUX C, MAVIER P, LOTERSZTAJN S (1995)  
Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway.  
*J. Clin. Invest.* 96: 42-49
- MARSDEN PA, SCHRAMEK H, DUNN MJ (1994)  
Renal actions of endothelin: Linking cellular signaling pathway to kidney disease.  
*Kidney Int.* 45: 336-344
- MASAKI T, KIMURA S, YANAGISAWA M, GOTO K (1991)  
Focus on molecular biology: molecular and cellular mechanisms of endothelin regulation: implications for vascular function.  
*Circulation* 84: 1457-68
- MATSUMOTO H, SUZUKI N, ONDAS H, FUJINO M (1989)  
Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 74-80
- MATSUMOTO H, SUZUKI N, SHIOTA K, INOUE K, TSUDA M, FUJINO M (1990)  
Insulin-like growth factor-I stimulates endothelin-3 secretion from rat anterior pituitary cells in primary culture.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 661-668
- MATSUMOTO H, UEMASU J, KITANO M, KAWASAKI H (1994)  
Clinical significance of plasma endothelin-1 in patients with chronic liver disease.  
*Dig. Dis. Sci.* 39: 2665-2670
- MATTINGLY RR, WASILENKO WJ, WOODRING PJ, GARRISON JC (1992)  
Selective amplification of endothelin-stimulated inositol 1,4,5-P<sub>3</sub> and calcium responses by v-src transformation of rat-1 fibroblasts.  
*J. Biol. Chem.* 267: 7470-7477
- MAZZOCCHI G, ROSSI GP, REBUFFAT P, MALENDOWICZ LK, MARKOWSKA A, NUSSDORFER GG (1997)  
Endothelins stimulate desoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in rat adrenal zona glomerulosa, acting through an endothelin A receptor coupled with protein kinase C- and tyrosine kinase-dependent signaling pathways.  
*Endocrinology* 138: 2333-2337
- MIHARA S, FUJIMOTO M (1993)  
The endothelin ET<sub>A</sub> receptor-specific effect of 50-235, a nonpeptide endothelin antagonist.  
*Eur. J. Pharmacol.* 246: 33-38
- MILLER V, BURNETT JC (1992)  
Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries.  
*Am. J. Physiol.* 263: H103-H108
- MILNER P, BODIN P, LOESCH A, BURNSTOCK G (1990)  
Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 649-656

- MISHKIN SY, POLLACK R, YALOVSKY MA, MORRIS HP, MISHKIN S (1981)  
Inhibition of local metastatic hepatoma growth and prolongation of survival after induction of hypothyroidism.  
*Cancer Res.* 41: 3040-3045
- MOLENAAR P, O'REILLY G, SHARKEY A, ET AL. (1993)  
Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium.  
*Circulation* 72: 526-538
- MONCADA S, GRYGLEWSKI R, BUNTING S, VANE JR (1976)  
An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.  
*Nature* 263: 663-665
- MORAITIS S, LANGDON SP, MILLER WR (1997)  
Endothelin expression and responsiveness in human ovarian carcinoma cell lines.  
*Eur. J. Cancer* 33: 661-668
- MORRIS HP (1965)  
Studies on the development, biochemistry and biology of experimental hepatomas.  
*Adv. Cancer Res.* 9: 227-302
- MORRIS HP, SLAUGHTER LJ (1979)  
Development, growth rate, degree of malignancy, and chromosome pattern of Morris transplantable hepatomas.  
*J. Toxicol. Environ. Health* 5: 433-452
- MORRIS HP, WAGNER BP (1968)  
Induction and transplantation of rat hepatomas with different growth rate including "minimal deviation" hepatomas.  
*Methods Cancer Res.* 4: 125-152
- MORRISON SD (1968)  
Effect of growth of a tumor on the regulation of water intake.  
*J. Natl. Cancer Inst.* 41: 1241-1248
- MOSMANN T (1983)  
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.  
*J. Immunol. Methods* 65: 55-63
- MULDOON LL, PRIBNOW D, RODLAND KD, MAGUN BE (1990)  
ET-1 stimulates DNA synthesis and anchorage-independent growth of rat-1 fibroblasts through a protein kinase C-dependent mechanism.  
*Cell. Regul.* 1: 379-390
- MÜNTER K, HERGENRÖDER S, UNGER L, KIRCHENGAST M (1996)  
Oral treatment with an ET<sub>A</sub>-receptor antagonist inhibits neointima formation induced by endothelial injury.  
*Pharm. Pharmacol. Lett.* 62: 90-92
- MURLAS CG, GULATI A, SINGH G, NAJMABADI F (1995)  
Endothelin-1 stimulates proliferation of normal airway epithelial cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 953-959
- NAKAMOTO H, SUZUKI H, MURAKAMI M, ET AL. (1989)  
Effects of endothelin on systemic and renal haemodynamics and neuroendocrine hormones in conscious dogs.  
*Clin. Sci.* 77: 567-572
- NAKAMUTA M, OHASHI M, TABATA S, TANABE Y, GOTO K, NARUSE M, NARUSE K, HIROSHIGE K, NAWATA H (1993)  
High plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivities in patients with hepatocellular carcinoma.  
*Am. J. Gastroenterol.* 88: 248-252

- NAKAMUTA M, TAKAYANAGI R, SAKAI Y, ET AL. (1991)  
Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 34-39
- NAKAYAMA Y, NONOGUCHI H, KIYAMA S, IKEBE M, TASHIMA Y, SHIMADA K, TANZAWA K, TOMITA K (1999)  
Intranephron distribution and regulation of endothelin-converting enzyme-1 in cyclosporin A-induced acute renal failure in rats.  
*J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 562-571
- NAMBI P, PULLEN M, CONTINO LC, BROOKS DP (1990)  
Upregulation of renal endothelin receptors in rats with cyclosporine A-induced nephrotoxicity.  
*Eur. J. Pharmacol.* 187: 113-116
- NAOMI S, IWAOKA T, DISASHI T, INOUE J, KANESAKA Y, TOKUNAGA H, TOMITA K (1998)  
Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells.  
*Circulation* 97: 234-236
- NELSON JB, CHAN-TACK K, HEDICAN SP, MAGNUSON SR, OPGENORTH TJ, BOVA GS, SIMONS JW (1996)  
Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer.  
*Cancer Res.* 56: 663-668
- NELSON JB, HEDICAN SP, GEORGE DJ, REDDI AH, PIANTADOSI S, EISENBERGER MA, SIMONS JW (1995)  
Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate.  
*Nat. Med.* 1: 944-949
- O'BRIEN RF, ROBBINS RJ, MCMURTRY IF (1987)  
Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance.  
*J. Cell. Physiol.* 132: 263-270
- O'REILLY G, CHARNOCK JONES DS, DAVENPORT AP, CAMERON IT, SMITH SK (1992)  
Presence of messenger ribonucleic acid for endothelin 1, endothelin 2, and endothelin 3 in human endometrium and a change in the ratio of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor subtype across the menstrual cycle.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 1545-1549
- OGAWA Y, NAKAO K, ARAI H, ET AL. (1991)  
Molecular cloning of a non- isopeptide-selective human endothelin receptor.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 248-255
- OHLSTEIN EH, ARLETH A, BRYAN H, ELLIOTT JD, SUNG CP (1992)  
The selective endothelin ET<sub>A</sub> receptor antagonist BQ 123 antagonizes endothelin-1- mediated mitogenesis.  
*Eur. J. Pharmacol.* 225: 347-350
- OKADA K, MIYAZAKI Y, TAKADA J, MATSUYAMA K, YAMAKI T, YANO M (1990)  
Conversion of big endothelin-1 by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 1192-1198
- OLIVER FJ, DE LA RUBA G, FEENER EP, LEE ME, LOEKEN MR, SHIBA T, QUERTERMOUS T, KING GL (1991)  
Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells.  
*J. Biol. Chem.* 266: 23251-23256
- ONG ACM (1996)  
Surprising new roles for endothelins.  
*Br. Med. J.* 312: 195-196
- ORTEGA-MATEO A, DE ARTINANO AA (1997)  
Highlights on endothelins: a review.  
*Pharmacol. Res.* 36: 339-351
- PAGOTTO U, ARZBERGER T, HOPFNER U, SAUER J, RENNER U, NEWTON CJ, LANGE M, UHL E, WEINDL A, STALLA GK (1995)  
Expression and localization of endothelin-1 and endothelin receptors in human meningiomas. Evidence for a role in tumoral growth.  
*J. Clin. Invest.* 96: 2017-2025

PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. (1987)

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.  
*Nature* 327: 524-526

PANETTIERI RA JR., GOLDIE RG, RIGBY PJ, ESZTERHAS AJ, HAY DW (1996)

Endothelin-1-induced potentiation of human airway smooth muscle proliferation: an ET<sub>A</sub> receptor mediated phenomenon.  
*Br. J. Pharmacol.* 118: 191-197

PEKONEN F, SAJONMAA O, NYMAN T, FYHRQUIST F (1992)

Human endometrial adenocarcinoma cells express endothelin 1.  
*Mol. Cell. Endocrinol.* 84: 203-207

PERNOW J, HEMSEN A, LUNDBERG JM (1989)

Tissue specific distribution, clearance and vascular effects of endothelin in the pig.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 647-653

POLLACK R, MISHKIN SY, MORRIS HP, YALOVSKI MA, MISHKIN S (1982)

Studies to elucidate the thyroid hormone dependence of Morris hepatoma 44.  
*Hepatology* 2: 836-842

PORSTMANN T, TERNYNCK T, AVRAMEAS S (1985)

Quantification of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response.  
*J. Immunol. Methods* 82: 169-179

RAGUKI H, TABUCHI Y, NAKAMARU M, ET AL. (1990)

Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 973-977

RANDALL MD, DOUGLAS SA, HILEY CR (1989)

Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat.  
*Br. J. Pharmacol.* 98: 685-699

RASCHAK M, GOCK S, UNGER L, HAHN A, AMBERG W, JANSEN R, ALKEN P, WEBER A, HERGENRÖDER S (1998)

LU 302 872 and its racemate (LU 224 332) show balanced endothelin-A/B receptor affinity, high oral activity, and inhibit human prostate tissue contractions.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31 (Suppl. 1): S241-S244

RASCHAK M, UNGER L, RIECHERS H, KLINGE D (1995)

Receptor selectivity of endothelin antagonists and prevention of vasoconstriction and endothelin-induced sudden death.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (Suppl. 3): S397-S399

RESINK TJ, HAHN AW, SCOTT-BURDEN T, POWELL J, WEBER E, BUHLER FR (1990a)

Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 1303-1310

RESINK TJ, SCOTT-BURDEN T, BOULANGER C, WEBER E, BUHLER FR (1990b)

Internalization of endothelin by cultured human vascular smooth muscle cells: characterization and physiologic significance.  
*Mol. Pharmacol.* 38: 244-252

RIECHERS H, ALBRECHT HP, AMBERG W, BAUMANN E, BERNARD H, BOHM HJ, KLINGE D, KLING A, MÜLLER S, RASCHAK M, UNGER L, WALKER N, WERNET W (1996)

Discovery and optimization of a novel class of orally active nonpeptidic endothelin-A receptor antagonists.  
*J. Med. Chem.* 39: 2123-2128

ROBERTS AB, ANZANO MA, WAKEFIELD LM, ROCHE NS, STERN DF, SPORN MB (1985)

Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 119-123

ROLLINO C, BORSA S, BELLONE G, PICCOLI G, EMANUELLI G (1995)

False positive results with MTT assay [letter].  
*J. Immunol. Methods* 185: 141-143

- RUBANYI GM, POLOKOFF MA (1994)  
Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology.  
*Pharmacol. Rev.* 46: 328-415
- SAENZ DE TEJADA I, CARSON MP, DE LAS MORENAS A, GOLDSTEIN I, TRAISH AM (1991)  
Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum.  
*Am. J. Physiol.* 261: H1078-H1085
- SAIDA K, MITSUI Y, ISHIDA N (1989)  
A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity.  
*J. Biol. Chem.* 264: 14613-14616
- SAKAMOTO A, YANAGISAWA M, SAKURAI M, TAKUWA Y, MASAKI T (1991)  
Cloning and functional expression of human cDNA for the ET<sub>B</sub> endothelin receptor.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 656-663
- SAKURAI T, YANAGISAWA M, TAKUWA Y, MIYAZAKI H, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T (1990)  
Cloning of cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of the endothelin receptor.  
*Nature* 348: 732-735
- SAMSON WK, SKALA KD, ALEXANDER BD, HUANG FL (1991)  
Hypothalamic endothelin: presence and effects related to fluid and electrolyte homeostasis.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 (Suppl. 7): S346-S349
- SAUDEK V, HOFLACK J, PELTON JT (1991)  
Solution conformation of endothelin 1 by <sup>1</sup>H NMR, CD, and molecular modelling.  
*Int. J. Pept. Protein Res.* 37: 174-179
- SCATCHARD G (1949)  
The attraction of proteins for small molecules and ions.  
*Ann. NY Acad. Sci.* 51 660-672
- SCHREY MP, PATEL KV, TEZAPSIDIS N (1992)  
Bombesin and glucocorticoids stimulate human breast cancer cells to produce endothelin, a paracrine mitogen for breast stromal cells.  
*Cancer Res.* 52: 1786-1790
- ŠEDO A, PROVERO P, REVOLTELLA RP, DI BARTOLO V, BEFFY P, MIZRAHI J (1993)  
BQ-123 inhibits both endothelin 1 and endothelin 3 mediated C6 rat glioma cell proliferation suggesting an atypical endothelin receptor.  
*J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 7: 95-98
- ŠEDO A, VANÍČKOVÁ Z (1996)  
Endothelins as cell growth regulators.  
*Folia Biol. Praha* 42: 79-82
- SERRADEIL-LE GAL C, JOUNEUX C, SANCHEZ-BUENO A, RAUFASTE D, ROCHE B, PREAUX A, MAFFRAND JP, COBBOLD PH, HANOUNE J, LOTERSZTAJN S (1991)  
Endothelin action in rat liver.  
*J. Clin. Invest.* 87: 133-138
- SHARIFI AM, SCHIFFRIN EL (1997)  
Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism.  
*J. Hypertens.* 15: 1441-1448
- SHEWCHUK LD, BARACOS VE, FIELD CJ (1996)  
Reduced splenocyte metabolism and immune function in rats implanted with the Morris hepatoma 7777.  
*Metabolism* 45: 848-855
- SHICHIRI M, HIRATA Y, MARUMO F (1991a)  
Endothelin 1 as an autocrine/paracrine factor for human tumor cell lines.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 (Suppl. 7): S76-S78
- SHICHIRI M, HIRATA Y, NAKAJIMA T, ANDO K, IMAI T, YANAGISAWA M, MASAKI T, MARUMO F (1991b)  
Endothelin 1 is an autocrine/paracrine factor for human cancer cell lines.  
*J. Clin. Invest.* 87: 1867-1871

- SHICHIRI M, KATO H, MARUMO F, HIRATA Y (1997)  
Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells.  
*Hypertension* 30: 1198-1203
- SHICHIRI M, SEDIVY JM, MARUMO F, HIRATA Y (1998)  
Endothelin-1 is a potent survival factor for c-myc-dependent apoptosis.  
*Mol. Endocrinol.* 12: 172-180
- SHINMI O, KIMURA S, SAWAMURA T ET AL. (1989)  
Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 587-593
- SIMONSON MS, DUNN MJ (1990)  
Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family.  
*FASEB J.* 4: 2989-3000
- SIMONSON MS, HERMAN WH (1993)  
Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogen signaling by endothelin-1.  
*J. Biol. Chem.* 268: 9347-9357
- SIMONSON MS, JONES JM, DUNN MJ (1992)  
Differential regulation of fos and jun gene expression and AP-1 cis-element activity by endothelin isopeptides. Possible implications for mitogenic signalling by endothelin.  
*J. Biol. Chem.* 267: 8643-8649
- SIMONSON MS, WANN S, MENE P, ET AL. (1989)  
Endothelin stimulates phospholipase C, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells.  
*J. Clin. Invest.* 83: 708-712
- STJERNQUIST M (1998)  
Endothelins - vasoactive peptides and growth factors.  
*Cell Tissue Res.* 292: 1-9
- STRELKOV AB, FIELDS AL, BARACOS VE (1989)  
Effects of systemic inhibition of prostaglandin production on protein metabolism in tumor-bearing rats.  
*Am. J. Physiol.* 257: C261-C269
- STUDER RK, BORLE AB (1982)  
Differences between male and female rats in the regulation of hepatic glycogenolysis. The relative role of calcium and cAMP in phosphorylase activation by catecholamines.  
*J. Biol. Chem.* 257: 7987-7993
- STUMPF C, GÖCK S, UNGER L, RASCHAK M (1997)  
LU 135 252 shows high endothelin-A receptor affinity and selectivity and oral efficacy leading to reduction of neointima formation in collared rabbit carotid arteries.  
*Arch. Pharmacol.* 355 (Suppl. 4): R103
- SUGIURA M, INAGAMI T, KON V (1989)  
Endotoxin stimulates endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 1220-1227
- SUZUKI N, MATSUMOTO H, KITADA C, MASAKI T, FUJINO M (1989)  
A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin.  
*J. Immunol. Methods* 118: 245-250
- SUZUKI T, KUMAZAKI T, MITSUI Y (1993)  
Endothelin 1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 823-830
- TAKASAKI C, YANAGISAWA M, KIMURA S, GOTO K, MASKI T (1988)  
Similarity of endothelin to snake venom toxin.  
*Nature* 335: 303
- TAKUWA N, TAKUWA Y, YANAGISAWA M, YAMASHITA K, MASAKI T (1989)  
A novel vasoactive peptide stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in swiss 3T3 fibroblasts.  
*J. Biol. Chem.* 264: 7856-7861

- TESSITORE L, COSTELLI P, BACCINO FM (1993)  
Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats.  
Br. J. Cancer 67: 15-23
- TISDALE MJ (1991)  
Cancer cachexia.  
Br. J. Cancer 63: 337-342
- URADE Y, FUJITANI K, ODA T, WATAKABE I, UMEMURA M, TAKAI M, OKADA T, SAKATA K, KARAKI H (1992)  
[Cys11-Cys15]-endothelin-1 (11-21), IRL 1038, is an antagonist specific for endothelin B receptors.  
FEBS Lett. 311: 12
- WAGNER OF, ET AL. (1992)  
Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells.  
J. Biol. Chem. 267: 16066-16088
- WANG Y, ROSE PM, WEBB ML, DUNN MJ (1994)  
Endothelins stimulate mitogen-activated protein kinase cascade through either ET<sub>A</sub> or ET<sub>B</sub>.  
Am. J. Physiol. 267: C1130-C1135
- WARNER TD, ALLOCK GH, MICKLEY EJ, CORDER R, VANE JR (1993)  
Comparative studies with the endothelin receptor antagonist BQ 123 and PD 142893 indicates at least three endothelin receptors.  
J. Cardiovasc. Pharmacol. 22 (Suppl. 8): S117-S120
- WARNER TD, DE NUCCI G, VANE JR (1989)  
Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat.  
Eur. J. Pharmacol. 159: 325-326
- WARNER TD, ELLIOT JD, OHLSTEIN EH (1996)  
California dreamin' 'bout endothelin: emerging new therapeutics.  
Trends Pharmacol. Sci. 17: 177-181
- WEITZBERG E, AHLBORG G, LUNDBERG JM (1991)  
Long-lasting vasoconstriction and efficient regional extraction of endothelin-1 in human splanchnic and renal tissues.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 180: 1298-1303
- WHELCHER A, EVANS J, POSADA J (1997)  
Inhibition of ERK activation attenuates endothelin-stimulated airway smooth muscle cell proliferation.  
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16: 589-596
- WOLLBERG Z, SHABO-SHINA R, INTRATOR N, ET AL. (1987)  
A novel cardiotoxic polypeptide from the venom of *Actractaspis engaddensis* (burrowing asp): cardiac effects in mice and isolated rat and human heart preparations.  
Toxicon 26: 525-534
- WU-WONG J, CHIOU WJ, DICKINSON R, OPGENORTH TJ (1997)  
Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells.  
Biochem. J. 328: 733-737
- XIE K, HUANG S, DONG Z, JUANG S-H, GUTMAN M, XIE Q-W, NATHAN C, FIDLER IJ (1995)  
Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells.  
J. Exp. Med. 181: 1333-1343
- XU D, EMOTO M, GIAID A, SLAUGHTER C, KAW S, DE WIT D, ET AL. (1994)  
ECE-1: a membrane bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1.  
Cell 78: 473-485
- XU G, SALEN G, LEA M, TINT GS, NGUYEN LB, BATTI AK, CHEN TS, SHEFER S (1996)  
Blocking late cholesterol biosynthesis inhibits the growth of transplanted Morris hepatomas (7288CTC) in rats.  
Hepatology 24: 440-445
- YAMASHITA J, OGAWA M, INADA K, YAMASHITA SI, MATSUO S, TAKANO S (1991)  
A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues.  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 74: 363-369

- YAMAUCHI T, OHNAKA R, TAKAAYANAGAI R, UMEDA F, NAWATA H (1990)  
Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells.  
*FEBS Lett.* 267: 16-18
- YANAGISAWA H, YANAGISAWA M, KAPUR RP, RICHARDSON JA, WILLIAMS SC, CLOUTHIER DE, DE WIT D, EMOTO N, HAMMER RE (1998)  
Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene.  
*Development* 125: 825-836
- YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K, MASAKI T (1988)  
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.  
*Nature* 332: 411-415
- YOHNN JJ, SMITH C, STEVENS T, MORELLI JG, SHURNAS LR, WALCHAK SJ, HOFFMAN TA, KELLEY KK, ESCOBEDO-MORSE A, YANAGISAWA M, KANE MA, ZAMORA MR (1994)  
Autoregulation of endothelin-1 secretion by cultured human keratinocytes via the endothelin B receptor.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1224: 454-458
- YOKOKAWA K, KOHNO M, YASUNARI K, MURAKAWA K, TAKEDA T (1991)  
Endothelin-3 regulates endothelin-1 production in cultured human endothelial cells.  
*Hypertension* 18: 304-315
- YOSHIMOTO S, ISHIZAKI Y, KURIHARA H, SASAKI T, YOSHIKUMI M, YANAGISAWA M, YAZAKI Y, TAKAKURA K, MUROTA S (1990)  
Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin.  
*Brain Res.* 508: 283-285
- YOSHIMOTO S, ISHIZAKI Y, SASAKI T, MUROTA SI (1991)  
Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelial production by cultured porcine cerebral endothelial cells.  
*Stroke* 22: 378-383
- YOSHIZAWA T, SHINMI O, GIAID A, ET AL. (1990)  
Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system.  
*Science* 247: 462-464
- YOSHIKUMI M, KURIHARA H, MORITA T, ET AL. (1990)  
Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 324-329
- ZAMORA MA, DEMPSEY EC, WALCHAK SJ, STELZNER TJ (1993)  
BQ123, an ET<sub>A</sub> receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells.  
*Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 9: 429-433
- ZHANG ZD, COX G (1996)  
MTT assay overestimates human airway smooth muscle cell number in culture.  
*Biochem. Mol. Biol. Int.* 38: 431-436
- ZHAO Y, SPRINGALL DR, HAMID Q, LEVENE M, POLAK JM (1995)  
Localization and characterization of endothelin-1 receptor binding in the blood vessels of human pulmonary tumours.  
*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (Suppl. 3): S341-S345
- ZICHE M, MORBIDELLI L, DONNINI S, LEDDA F (1995)  
ET<sub>B</sub> receptor promote proliferation and migration of endothelial cells.  
*Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (Suppl. 3): S284-S286



## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	<i>activating protein-1</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
Big-ET	Big-Endothelin (=Pro-ET)
Bq	Becquerel
BrdU	5-bromo-2'-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CA	Karzinom
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	3',5'-cyclo-Guanosinmonophosphat
cpm	<i>counts per minute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ECE	<i>endothelin converting enzyme</i>
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
ET	Endothelin
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
g	Fallbeschleunigung
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
i.p.	intraperitoneal
irBig-ET	immunreaktives Big-Endothelin

irET	immunreaktives Endothelin
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MEM	<i>modified eagles medium</i>
MH	<i>Morris-Hepatom</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NO	<i>nitric oxide</i> (Stickstoffmonoxid)
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i>
PKC	Proteinkinase C
Präpro-ET	Präproendothelin
Pro-ET	Proendothelin (=Big-ET)
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
SE	<i>standard error</i> (Standardfehler)
STX	Sarafotoxin
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
vs.	versus
ZNS	zentrales Nervensystem

## 8 Danksagung

Zuerst möchte ich meinen Eltern Dank aussprechen für die Unterstützung, auf die ich während meines Studiums und auch bei der Anfertigung dieser Arbeit jederzeit voll zählen konnte.

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn PD Dr. med. Berthold Hoher für die Überlassung des Themas sowie die gute und engagierte Betreuung.

Die Einführung in die Tricks und Tücken des Laboralltags verdanke ich vor allem Rüdiger Zart, Ines George, Anja Schwarz und Ines Müller, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Die Mehrzahl der Experimente und insbesondere die Tierversuche wären ohne das großzügige Gastrecht im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin und die Hilfe der Tierpfleger nicht möglich gewesen.

Viele aus der Arbeitsgruppe in Dahlem - insbesondere Jan, Jörg, Karim, Michael und Saban - sind mehr als einmal eingesprungen wenn Hilfe vonnöten war und haben zu einer stets angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen. Die Sonographie-Aktion mit Ines und Jörg werde ich wohl nicht so schnell vergessen...

Ganz herzlichen Dank auch an Pia und Christine für ihre geduldige Hilfe bei den Zellkulturen im nephrologischen Labor der Charité.

Vielen Dank an Dr. G. Baatz für die Ermöglichung der Sonographie in ihrer Tierarztpraxis in Berlin/Lichterfelde, an Dr. med. Lun und Dipl. chem. Priem für das Messen der vielen Proben sowie an Dr. med Trautner für die Hilfe bei den statistischen Berechnungen.

Last but not least ein Dankeschön an Silja Baur für die kritische Durchsicht des Manuskripts.



## **9 Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.



